

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

**Doktori (PhD) értekezés**



**Ernszt Dávid**

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Az Immunológia Alapjai Program

Doktori iskola vezető: Prof. Dr. Szekeres Júlia

Programvezető: Prof. Dr. Berki Tímea

Témavezető: Dr. Kvell Krisztián

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2018.

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítések jegyzéke.....	3
Bevezetés.....	5
Irodalmi áttekintés.....	6
Tímusz.....	6
Tímusz anatómiája, szerkezete.....	6
A tímusz fejlődése.....	6
A tímusz funkciója, a T-sejtek fejlődése.....	7
Az immunrendszer öregedése.....	10
A tímusz öregedése.....	11
A tímusz korai öregedésének okai és mechanizmusa.....	12
PPAR $\gamma$ .....	16
Lipodisztrófia.....	18
Örökletes lipodisztrófia.....	18
Célkitűzések.....	20
Anyag és módszer.....	21
Állatok tenyésztése és tartása.....	21
Humán tímusz minták.....	21
Immunhisztokémia.....	21
Immunfluoreszcens jelölések.....	22
Áramlási citometriás mérések.....	22
Trec kópiaszám mérés.....	23
Orális tolerancia kialakítása egérben.....	23
Influenza vakcináció egérben.....	24
Statisztikai analízis.....	24
Eredmények.....	25
A PPAR $\gamma$ expressziójának változása az öregedés során.....	25
A PPAR $\gamma$ hatása a tímusz szerkezetére.....	28
A PPAR $\gamma$ hatása tímusz naív T-sejt termelésre, és a timociták fejlődésére.....	30
A PPAR $\gamma$ hatása a perifériás T-sejt populációkra felnőtt korban.....	32
A PPAR $\gamma$ hatása az immunológiai funkciókra.....	35

A PPAR $\gamma$ hiányállapot hatása a humán immunrendszer öregedésére .....	37
Diszkusszió.....	39
Új eredmények összefoglalása .....	43
Irodalomjegyzék.....	44
Publikációk jegyzéke.....	55
Az értekezés alapját képező publikáció.....	55
Egyéb eredeti publikációk .....	55
Kongresszusi prezentációk .....	56
Könyvfejezet.....	59
Köszönetnyilvánítás .....	60

## Rövidítések jegyzéke

AIRE	autoimmun regulátor
BAT	barna zsírszövet (brown adipose tissue)
CCL	C-C kemokin ligand
CCR	C-C kemokin receptor
CD	cluster of differentiation
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
DN	dupla negatív
DP	dupla pozitív
EMT	epitel-mesenchymális transzformáció
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
FGF	fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
FoxN1	forkhead box protein N1
Foxp3	forkhead box P3
FPLD	familiáris parciális lipodisztrófia
FPLD2	familiáris parciális lipodisztrófia 2-es altípusa
FPLD3	familiáris parciális lipodisztrófia 3-as altípusa
IGF	inzulin szerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
IL	interleukin
Ly51	glutamyl aminopeptidase
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)
ns	nem szignifikáns
OVA	ovalbumin
PBMC	perifériás mononukleáris vérsejtek (peripheral blood mononuclear cells)
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PPAR $\gamma$	peroxisome proliferator activated receptor gamma

PPAR $\gamma$ KO	peroxisome proliferator activated receptor gamma génhiányos
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa-B
SP	egyszeresen pozitív (single positive)
TcR	T-sejt receptor (T-cell Receptor)
Trec	T cell-recombination excision circle
TZD	thiazolidinedione
WAT	fehér zsírszövet (white adipose tissue)
Wnt4	Wingless/Integrated family member 4

## Bevezetés

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

## Irodalmi áttekintés

### **Tímusz**

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

### **Tímusz anatómiája, szerkezete**

A tímusz a mellkasban a szegycsont mögött a perikardiális mediasztínumban (gátorüregben) helyezkedik el. Anterior helyzetben található a szív fő ereihez képest és ventrálisan az aortaívhez viszonyítva. A tímusz két egymástól elkülönülő kötőszövettel összekapcsolt lebenyből áll, melyeket vékony kötőszöveti tok határol. A tímuszt ellátó artéria a kortikomedulláris junkció területén lép be a tímuszba. Ezután kapillárisokra ágazik, melyek behálózzák a kortikális és medulláris területeket. A kéreg állományban a kapillárisok makrofágokkal, epitél sejtekkel és perivaszkuláris limfocitákkal együtt alkotják a vér-tímusz gátat. A kapillárisok vénákba gyűlnek, amik a kortikomedulláris junkció területén lépnek ki a tímuszból. A tímuszban csak efferens nyirokerek találhatóak [1].

A tímusz szerkezetét a nyirokszervek közt egyedülálló módon főként epitél sejtek alkotják. Az epitél sejtek egy olyan hálózatot alkotnak, melyben sűrűn helyezkednek el T-limfociták. Az epitél hálózat két, szerkezetben és funkcióban eltérő részre oszlik: kéregre (kortex) és velőállományra (medulla). A két területet egymástól az erekkel sűrűn átszőtt kortikomedulláris régió határolja el. Hisztológiai metszeten a kortex sötétebben festődő, sejteket sűrűn tartalmazó területként, a medulla világosabb, lazább szerkezetet mutató területként látható [1].

### **A tímusz fejlődése**

A tímusz embrionális fejlődését egérben részletesen megfigyelték. A tímusz a harmadik garatív endodermális részéből fejlődik ki az embrionális kor 10,5. napjától kezdődően. Fejlődése kezdetben a velőcső eredetű mesenchymális sejtekből és perivaszkuláris kötőszöveti sejtekből indul meg [2]. Először a terhesség 12. napján érkeznek hematopoetikus progenitorok a tímuszba [3]. Ebben az állapotban még éretlen a tímusz epitél állománya, és olyan bipotens sejtekből áll, amik később képesek mind medulláris, mind kortikális epitél sejtekké fejlődni [4]. Az epitél

fejlődésének korai szakaszában elengedhetetlenül szükséges a velőcső eredetű mesenchymális sejtek által biztosított fibroblaszt növekedési faktorok (FGF, fibroblast growth factor), ezen belül az FGF10 és az FGFR2IIIb, és az inzulin szerű növekedési faktorok (IGF, insulin-like growth factor), valamint az IGF-1 és az IGF-2 által közvetített stimulusok megléte a megfelelő fejlődéshez. Ezeknek a stimulusoknak a hiányában ugyan a tímusz epitél sejtek differenciálódása végbe megy, de expansiójuk elmarad [5][6][7]. Ezt követően válik szükségessé a timociták jelenléte is, hogy megfelelően végbe menjen a tímusz stroma organizációja [8]. A tímusz epitél hálózata által közvetített szignálok elengedhetetlenek a timociták fejlődéséhez, a timocitákból érkező jelek pedig nélkülözhetetlenek a tímusz stroma sejtjeinek a működéséhez és fenntartásához [9].

A közös előalakból kifejlődő kortikális és medulláris tímusz epitél sejtek differenciálódásához rendkívül fontos a FoxN1 (forkhead box protein N1) transzkripciós faktor jelenléte [10][11]. A közös előalakból származó epitél sejtek, később két funkcióban és lokalizációban jól elkülöníthető csoportot alkotnak. A kortikális epitél sejtekre a citokeratin 8, EpCAM1 (epithelial cell adhesion molecule), Ly51 (glutamyl aminopeptidase), CD205, MHC-I és MHC-II molekulák expressziója jellemző. A medulláris epitél sejtek citokeratin 5, CD326, MHC-II és CD80 markereket expresszálnak [12]. A medulláris epitél sejtek további két alcsoportra oszthatók az MHC-II és CD80 expresszió alapján [8].

A tímusz medulláris kompartmentjének megfelelő fejlődése kiemelten fontos, hisz a medulláris epitélium és a B-sejtek végzik a negatív szelekciót, mely során az autoreaktív T-sejtekben apoptózist indukálnak. A medulla kialakulásának fő irányítói a nukleáris faktor-kB (NF-kB) család tagjai [13]. A medulláris epitélium egyik egyedi funkciója, hogy random expresszálna a sejt minden saját antigénjét, ezzel ellenőrizve a fejlődő T-sejtek autoreaktivitását. Ezt a random expressziót az AIRE (autoimmun regulátor) transzkripciós faktor indukálja, míg az AIRE expresszióját a CD4<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> inducer sejteken található RANK ligand (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) aktiválja az NF-kB-n keresztül [14].

### **A tímusz funkciója, a T-sejtek fejlődése**

A tímusz legfőbb feladata a T-sejtek érésének és szelekciójának irányítása. A tímusz biztosítja azt a mikrokörnyezetet és azokat a stimulusokat, melynek eredményeként a csontvelőből származó T-sejt előalakok funkcióképes, a szervezet saját antigénjeire toleráns T-limfocitákká fejlődnek. Az antigén specifikus T-sejt receptort (TcR, T-cell Receptor) expresszáló T-limfocitáknak alapvető szerepük van az adaptív immunrendszerben [15]. A T-sejt receptor antigén felismerő része génátrendeződéssel jön létre. A génátrendeződés miatt feltétlenül



szükséges kiválogatni az MHC molekulák által aktiválódni képes TcR-rel rendelkező T-sejteket, ez a pozitív szelekció. Ezen túlmenően a génátrendeződés során létrejött saját antigénre specifikus autoreaktív T-sejteket is eliminálni kell, ez a folyamat a negatív szelekció során megy végbe. A pozitív szelekció a kortikális tímusz epitélium feladata, míg a negatív szelekciót a tímusz medulláris epitéliuma és a tímuszban található dendritikus sejtek végzik [16].

A T-sejtek a csontvelőben keletkeznek, amit fejlődésük korai szakaszában elhagynak és a tímuszba vándorolnak. A csontvelőből származó előalakok a kortikomedulláris junkció területén lépnek be a tímuszba [17]. Ezek az előalakok még nem expresszálják sem a TcR-t, sem a CD4 és CD8 sejtfelszíni molekulákat, így dupla negatív (DN) sejteknek nevezzük őket [18]. A DN sejteket a CD25 és CD44 markerek expressziója alapján további alcsoportokra oszthatjuk. A DN1 sejtek ( $CD44^+/CD25^-$ )  $\alpha\beta$  T-sejtekké,  $\gamma\delta$  T-sejtekké, sőt akár NK sejtekké is differenciálódhatnak [19]. A tímuszba érkező korai T-sejt előalakok a kortikális epitél sejtek által termelt DLL4 (Notch ligand) és IL-7 citokin hatására indulnak el a T-sejtes differenciálódás útján [20][21]. A T-sejt irányú elköteleződést követően a sejtek a DN2 ( $CD44^+/CD25^+$ ) fázisba lépnek, megindul a T-sejt receptor  $\beta$  láncának génátrendeződése miközben a sejtek keresztül vándorolnak a tímusz kortikális területén [19]. A DN3-as ( $CD44^-/CD25^+$ ) szakaszban felépül a pre-TcR komplex, mely gátolja az apoptózist, beindítja a TcR  $\alpha$  lánc génátrendeződését, és sejtosztódást indukál a fejlődő T-sejtekben [22]. A pre-TcR komplex gátolja a CD25 expressziót, így a sejtek a DN4 ( $CD44^-/CD25^-$ ) fázisba lépnek, ahol megkezdődik a CD4 és CD8 sejtfelszíni molekulák expresszálása, mellyel a sejtek a dupla pozitív (DP) fázisba kerülnek [23]. A DP sejtek, már teljesen funkcionális TcR-rel rendelkeznek. A fejlődő T-sejtek a DP stádiumban esnek át a pozitív szelekción, a tímusz kortikális területén [24].

Egerekben naponta 50 millió dupla pozitív (DP) T-sejt keletkezik, melynek 90%-a apoptotizál a pozitív szelekció során [16]. A kortikális epitél sejtekben speciális proteolitikus folyamatok játszódnak le, aminek eredményeként a pozitív szelekcióhoz szükséges egyedi peptidok expresszálódnak az epitél sejtek felszínén, az MHC molekulákkal együtt. A CD8 szelekcióhoz a timoproteozómában lévő Psmb11 aktivitás, a CD4 szelekcióhoz a lizoszómális cathepsin L és Prss16 aktivitás szükséges [25][26]. Amikor a DP T-sejtek kapcsolódnak a tímusz kortikális epitél sejtjein expresszált MHC molekulákhoz, túlélést-elősegítő jelátvitel indul el az enyhe affinitást mutató sejtekben. Az affinitással nem rendelkező, vagy túl erős affinitást mutató sejtekben apoptózis indukálódik. A pozitív szelekciót túlélő T-sejtek  $CD4^+$  vagy  $CD8^+$  SP (single pozitív) sejtekké differenciálódnak attól függően, hogy melyik MHC molekulához

mutatnak nagyobb affinitást. Az MHC-I a CD8, míg az MHC-II molekula a CD4 irányú differenciálódást serkenti [27].

A pozitív szelekción átesett T-sejtek expresszálják a CCR7 kemokin receptort, és a tímusz medulláris régiói felé vándorolnak, ahol a medulláris epitél sejtek expresszálják a CCR7 ligandjait a CCL19-et és a CCL21-et [28]. A medullában a dendritikus sejtek és a medulláris epitél sejtek végeznek antigén prezentációt. Saját antigénekre adott pozitív válasz esetén az autoreaktív T-sejtekben apoptózis indul meg. Ezt a folyamatot nevezik negatív szelekciónak [16]. Azért, hogy a sejt összes saját antigénjére tesztelve legyenek a T-sejtek, a tímusz medulláris epitél sejtjei random expresszálják a genomban megtalálható összes fehérjét, és prezentálják őket a fejlődő T-sejteknek. A folyamat egyik fő regulátora az AIRE [29]. A medulláris epitél sejtek nem csak expresszálják és bemutatják a saját antigéneket, hanem azok egy részét átadják a dendritikus sejteknek is, amik szintén antigén prezentációt végeznek [30]. A negatív szelekció során szinte az összes autoreaktív T-sejt eliminálódik. Az autoreaktív T-sejtek fennmaradó része nem apoptotizál. Ezek a sejtek Foxp3 transzkripciós faktort expresszálnak és belőlük alakulnak ki a regulátor T-sejtek. A regulátor T-sejtek feladata az immunológiai tolerancia fenntartása és az immunológiai folyamatok szabályozása [31]. A negatív szelekciót túlélő immár érett, naiv T-sejtek elhagyják a tímuszt és a periférián lévő immunológiai szövetekbe vándorolnak.

A pozitív és negatív szelekció eredményeként a tímuszt csak olyan T-sejtek hagyják el, amik funkcióképes TcR-el rendelkeznek és toleránsak a szervezet antigénjeivel szemben [12].

## **Az immunrendszer öregedése**

Idős korban, a szervezet védekezőképessége jelentősen romlik. Ez ugyan nem jelent teljes immunhiányos állapotot, de a csökkent immunológiai funkciók következtében magasabb a súlyos kimenetelű fertőzések aránya [32]. Mindemellett az oltások is csökkent hatékonyságot mutatnak [33]. Az öregedés főként az adaptív immunrendszert érinti így a B- és T-sejtek képződését és a már érett sejtpopuláció összetételét és minőségét is befolyásolja [34]. Idős korban csökken a limfocita termelés, melynek főbb okai a hematopoetikus őssejtekben és a tímusz epitélben lezajló változások [35][36]. Immunológiai szempontból a hematopoetikus őssejtek legjelentősebb változása, hogy számuk ugyan nő, de csökken a limfocita termelő képességük, ugyanakkor a mieloid sejtek termelése fokozódik [37]. A fokozott termelés ellenére a megfelelően funkcionáló mieloid sejtek aránya folyamatosan csökken, mivel az őssejtek osztódásában az öregedés során nő a hiba esélye, így a frissen keletkező mieloid sejtek között egyre gyakrabban fordulnak elő nem megfelelően funkcionáló sejtek [38][39]. Az egyre kisebb számú limfocita termelő őssejt mellett, a keletkező B- és T-sejt előalakok csökkent osztódási képességet és gyakoribb apoptózist mutatnak, mellyel súlyosbítják az öregedés immunrendszerre gyakorolt hatását [40][41].

Habár a limfociták termelése folyamatosan csökken, teljesen mégsem szűnik meg, még nagyon idős korban sem. Mindemellett a periférián található limfoid sejtek száma sem csökken lényegesen az öregedés során. Azonban, ha számban nem is, de összetételben és minőségben jelentős változások mennek végbe a periférián megtalálható limfocita populációban, ilyen például a memória T-sejtek arányának növekedése, vagy az IgM<sup>+</sup> memória B-sejtek számának csökkenése. Ezeknek a változásoknak a következménye az idős korban tapasztalható csökkent immunitás és a gyakoribb autoimmun megbetegedések [34]. Ugyan a T-sejtes immunitás hamarabb és súlyosabban érintett az öregedésben, a B-sejtes immunitásban bekövetkező változások, mint például az oltások hatására kialakuló plazmasejtek csökkent száma, vagy a gyengébb minőségű antitestek termelése is jelentősen hozzájárul az időskorban gyengült immunológiai funkciók kialakulásához [42][43].

Az időskori immunológiai rendellenességekben több tényező is szerepet játszik. Az autoimmun folyamatok erősödésének fő oka a tímusz hanyatlása, aminek következtében egyre több autoreaktív T-sejt keletkezik, valamint az autoimmun folyamatok szabályozásának csökkent hatékonysága [44][45]. Meggyengülnek a védekező folyamatok is, ami elsősorban az új antigének elleni csökkent immunválaszban érhető tetten. Ennek oka főként, hogy a tímusz öregedése miatt csökken a naív T-sejtek száma a szervezetben, ami pl. a vírus-partikulumok

csökkent felismeréséhez vezet [46]. Ezen túlmenően idős korban az immunrendszer szabályzó folyamatai is sérülnek, melynek következtében ritkábban alakul ki adekvát immunválasz [47].

### **A tímusz öregedése**

A tímusz öregedése a többi szervnél jelentősen korábban megkezdődik. A tímusz epitél állományának csökkenése emberben már gyermekkorban elkezdődik, a pubertás során felgyorsul és 40-50 éves korban a tímusz kapacitása 10%-ra csökken [48] [49]. Már egy éves kortól megfigyelhetők hisztológia változások a tímuszban, ilyenek a perivaszkuláris terek növekedése és a zsírszövet lassú felszaporodása [50]. A tímusz öregedésével együtt jár a T-sejtes immunitás csökkent funkcionalitása, ami a fertőzések, tumoros elváltozások és autoimmun betegségek kialakulásának magasabb kockázatát eredményezi idős korban [51].

A tímusz öregedése egerekben részletesebben ismert. Az itt megfigyelt folyamatok bár sokban egyeznek az embereknél leírtakkal, azonban néhány eltérést is megfigyeltek a két faj között. Ilyen például, hogy míg egerekben a tímusz mérete folyamatosan csökken az öregedés során, addig emberekben a tímusz mérete lényegesen nem változik, azonban a funkcionális szöveti részek helyét felváltják a megnagyobbodó perivaszkuláris terek és a zsírszöveti állomány [52]. A tímusz öregedése egereknél 7 hetes korban kezdődik [53]. Három hónapos kortól már egyértelműek a tímusz szerkezeti változásai [54]. A kortex-medulla határok elmosódnak [53], a medulla szerkezete felbomlik [55]. A tímusz stroma állománya fiatal korban főként a kortikális és medulláris epitél sejtekből áll, emellett makrofágok, endotél sejtek, antigén prezentáló dendritikus sejtek és mesenchymális eredetű fibroblasztok is a tímusz stroma állományát alkotják [56]. Öregedés során a tímusz stroma állományának összetétele megváltozik. Az epitél sejtek száma csökken, a fibroblasztok száma nő, és egyre nagyobb mennyiségben jelennek meg adipociták a tímuszban [8][48]. Az epitél sejtek helyét átvevő adipociták eredetére két fő elmélet létezik. Az egyik elképzelés szerint a tímusz epitél sejtek eltűnésével felszabaduló niche a tímuszon kívülről érkező adipocita előalakok által kerül benépesítésre. Ezek a sejtek itt osztódásnak indulnak és zsírsejteké differenciálódnak [57]. Ezt az elméletet nem támogatja az, hogy a tímusz involúciója együtt jár a tímusz stroma rezidens sejtjeiben a PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ ) expresszió erősödésével [54]. Másik elmélet szerint a tímusz epitél elveszti funkcionalitását és epitél-mesenchymális transzformáció (EMT) során fibroblaszt sejté alakul. Ezt követően ezek a fibroblasztok differenciálódnak adipocita irányba. Ezt az elméletet alátámasztják azok a kutatások melyek kimutatták, hogy a tímusz epitél képes EMT-re, és az így létrejött fibroblasztok fokozott PPAR $\gamma$  expressziót mutatnak, melynek következtében adipocita irányú elköteleződést mutatnak [58].

A tímusz stroma állományának öregedéssel együtt járó hanyatlása és a tímuszban egyre nagyobb arányban megjelenő zsírsejtek, összefüggésben állnak a csökkenő naiv T-sejt termeléssel [59]. A csökkenő naiv T-sejtek száma és a memória T-sejtek arányának növekedése a periférián együtt a T-sejt receptor diverzitás csökkenését eredményezik, ami autoimmun betegségek, daganatos elváltozások, valamint fertőzések kialakulásának valószínűségét növeli [60]. A tímusz medulláris epitél sejtjeiben az antigén prezentációban használt szövet specifikus antigének expressziója is csökken az öregedés során, ennek következtében a negatív szelekció szintén kevésbé hatékony. Így nagyobb valószínűséggel kerülnek autoreaktív T-sejtek a perifériára, aminek következtében megnő az autoimmun megbetegségek kockázata is idősebb korban [55].

### **A tímusz korai öregedésének okai és mechanizmusa**

A tímusz öregedésének háttérben álló folyamatok a mai napig sem ismertek teljesen. Az öregedést beindító és az öregedés során lejátszódó molekuláris mechanizmusokat még nem írták le minden részletükben. A tímusz korai öregedésének okairól több feltételezés is létezik, azonban minden kétséget kizáró módon még egyik elméletet sem sikerült bizonyítani. Így a mai napig számos kutatás folyik, melynek célja a tímusz öregedésének részletes megértése.

Az már biztosnak mondható, hogy a tímusz korai öregedése a stroma sejtekből, főként az epitél sejtekből indul ki, és nem a hematopoetikus sejtekből [55]. Ezt alátámasztja, hogy a tímusz már hét hetes korban öregedésnek indul egerekben, azonban a csontvelő és a hematopoetikus sejtek öregedésének legkorábbi jelei hét hónapos korban mutatkoznak először. Így a limfoid sejtek öregedése nem játszhat szerepet a tímusz öregedésének kialakulásában [34]. Ezt támasztja alá az is, hogy idős egerekből származó csontvelő által termelt T-sejt előalakok is képesek kolonizálni a fiatal tímuszt és ott naiv T-sejtekké fejlődni [61]. Továbbá transzkripciós elemzések kimutatták, hogy egy éves egerek tímuszában a limfoid sejtek nem mutatnak eltérést, míg a stroma sejtekben jelentős génexpressziós változások figyelhetők meg fiatal korú egerekhez képest [62][55].

A FoxN1 kulcsfontosságú a tímusz epitél sejtjeinek kialakulásában és jelentős változást mutat öregedésük közben. A FoxN1 egy transzkripciós faktor, mely azokat a géneket aktiválja, melyek a tímusz epitél sejtek differenciálódásához szükségesek [63][64]. A FoxN1 egérben az embrionális fejlődés 11. napján, emberben a 6. héten jelenik meg és indukálja a tímusz organogenezist Wnt4 (Wingless/Integrated family member 4) irányítása alatt [65][66][67]. Egérben a FoxN1 gén teljes hiánya a tímusz epitél sejtek és az epitél hálózat fejlődési rendellenességét okozza, aminek következtében súlyos immundeficiens állapot jön létre, mely

állapotot Nude fenotípusnak nevezzük [68]. Idős egerekben a FoxN1 expressziójának csökkenését figyelték meg [69] a Wnt4 csökkenésével együtt [70]. Kimutatták, hogy a FoxN1 expresszió mesterséges csökkentése felgyorsítja a tímusz öregedését [71]. Ezzel szemben a tímuszba injektált FoxN1 cDNS részben javította a tímusz funkciót öreg egerekben [72]. A FoxN1 központi szerepét mutatja az a tanulmány is, melyben kimutatták, hogy a FoxN1 fokozott expressziója megőrzi a tímusz funkcióját [73]. Megerősítő jellegű az a kísérlet is, mely kimutatta, hogy idős tímuszban a FoxN1 indukció visszaállította a tímusz öregedés előtti szerkezetét és a T-sejt termelést [74]. A FoxN1 aktivitását a Wnt4 gliko-lipoprotein szabályozza [66][67], így a Wnt4 közvetlen szerepet játszik a tímusz fejlődésében [75][76]. A Wnt4-et a timociták és az epitél sejtek is termelik [77]. A Wnt4 expressziójának csökkenése együtt jár a tímusz öregedésével [70]. Mivel a FoxN1 aktivitása a Wnt4 jelenlététől függ, így feltételezhető, hogy az öregedés során a FoxN1-aktivitás csökkenése a Wnt4 gátlásán keresztül alakul ki. A kanonikus és nem kanonikus Wnt-jelátvitel változásai egyaránt szerepet játszanak a tímusz öregedésében, de ezek a változások inkább következményei és nem okozói a tímusz öregedésének [55]. Így a FoxN1 és a Wnt4 expressziójában bekövetkezett változásokról is feltételezhető, hogy nem indukálják a tímusz öregedését, hanem annak következtében alakulnak ki.

A tímusz öregedését jelentősen befolyásolják a hormonális hatások, különösen a szexuál-szteroidok. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy ivartalanítást követően a tímusz funkciói valamelyest javulnak [62]. A közismert tímusz persistens esetében is az elégtelen kortikoszteroid-háztartás tüneteként jelentkezik a tímusz involúció elmaradása [78][79][80].

Idősebb egerekben kasztrációt követően a tímusz növekedésnek indul. A stroma állomány és a limfoid sejtek száma egyaránt megnő. Azonban a szövet-specifikus antigének expressziós mintázata nem tér vissza a fiatalkori szintre, hanem az idős tímusszal megegyező szintet mutat. Így a tímusz funkciója nem regenerálódik. Továbbá a regenerálódás átmeneti, pár nap után megáll, majd újabb hanyatlás indul be, ami rövid idő alatt eléri a kasztráció előtti szintet. Feltételezhető, hogy a kasztráció által kiváltott tímusz regeneráció csak egy akut válasz a hirtelen bekövetkező, nagymértékű hormonális változásra és hosszú távon nem eredményezi a tímusz regenerálódását [55]. Azonban ezekből a megfigyelésekből következtethetünk arra, hogy a szexuál-szteroid hormonok jelenléte negatív hatással van a tímuszra. Ezt a feltevést erősíti az a megfigyelés is, hogy a tímusz öregedése a pubertás idején gyorsul fel, amikor a szexuál szteroid hormonok szintje jelentősen megemelkedik [81].

Ugyan még minden részletében nem ismert, hogy a különböző nemi hormonok milyen módon hatnak a tímuszra, már számos megfigyelés született arról, hogy az egyes szexuál-szteroid

hormonok szintjében bekövetkező változások milyen következménnyel járnak a tímuszban. Megfigyelték, hogy az androgén hormonok hiányában a tímusz megnagyobbodik, illetve időskori androgén megvonás esetén a tímusz regenerálódni kezd [82][62]. Alacsony tesztoszteron szinttel rendelkező férfiak vérében megnövekedett naiv T-sejt arányt mutattak ki. A tesztoszteron fiziológias szintre történő emelésével a naiv T-sejt arány is a normális értékre csökkent [83]. Az androgén hormonok pozitív hatást is kifejtenek a T-sejtes immunitásra, mivel a tímusz epitél sejtekben serkentik az AIRE gén expresszióját, így az autoreaktív T-sejtek negatív szelekciója hatékonyabbá válik [84]. Az androgén receptorok jelenléte a tímusz epitél sejtjein és az érett T-sejteken is kimutatható, így az androgén hormonok nem csak a T-sejtek fejlődésére, hanem a periférián betöltött funkciójukra is hatással vannak [85][86]. Az ösztrogén hormonok tímuszra gyakorolt hatásai is részben ismertek. Ösztrogén kezelés hatására a tímusz kéregállományának csökkenése figyelhető meg [87]. Ennek az elváltozásnak a legfőbb oka, hogy az ösztrogén gátolja a kéregben található korai T-sejt előalakok osztódását, aminek következtében jelentősen csökken a dupla pozitív timociták száma [88][89]. Az ösztrogén hormonok, az androgénnel ellentétben, negatív hatást fejtenek ki a medulláris epitél sejtekben az AIRE gén expressziójára. Míg az androgének közvetve fejtik ki hatásukat, addig az ösztrogén közvetlenül hat az AIRE expresszióra. Azonos koncentráció mellett az ösztrogén negatív hatása dominál [90]. Feltételezhetően ez az egyik oka, hogy nőkben gyakrabban fordulnak elő autoimmun betegségek [91]. Megfigyelték, hogy terhesség során mind a T-, mind a B-limfociták fejlődése gátlódik, ezzel párhuzamosan a tímusz involúciója is megfigyelhető. Azonban a terhesség után a tímusz regenerálódásnak indul, a naiv T-sejt termelés a terhességet megelőző szintet közelíti meg [92][93]. A terhesség során lejátszódó tímusz involúcióban a progeszteron jelentős szerepet játszik. A progeszteron tímusz epitélre gyakorolt hatását progeszteron receptoron keresztül fejtik ki. A progeszteron az ösztrogénnel szinergikusan fejtik ki hatásukat, progeszteron receptor hiányában a tímusz sokkal enyhébb elváltozásokat mutat terhesség során. A progeszteron által kiváltott tímusz involúció szükséges a normál reprodukciós képességhez, hiányában csökken a megtermékenyítés valószínűsége és nő a vetélés kockázata [94].

A tímusz öregedésében szerepet játszik a zsírsejtek differenciálódását irányító PPAR $\gamma$  transzkripciós faktor is. Megfigyelték, hogy a PPAR $\gamma$  expresszió megnő a tímusz öregedése során [54]. Továbbá kimutatták, hogy a PPAR $\gamma$  aktivációja negatív hatással van a naiv T-sejt termelésre, csökkenti a T-sejt receptor diverzitást, valamint serkenti a tímusz elzsírosodását [95]. Megfigyelték, hogy a tímusz epitél sejtek képesek EMT útján fibroblasztá alakulni, és ezekben a sejtekben PPAR $\gamma$  aktivitás mutatható ki [58]. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a

PPAR $\gamma$  központi szerepet tölt be a tímusz elzsírosodásában. Ezt a feltevést tovább erősíti, hogy a szexuál-szteroid hormonok hatással vannak a PPAR $\gamma$  aktivitásra [96]. Így a pubertással együtt járó hormonális változások a PPAR $\gamma$ -n keresztül is serkenthetik a tímusz öregedését.



## PPAR $\gamma$

A PPAR $\gamma$  a PPAR család tagja. A PPAR család a transzkripciós faktorok ligand-indukált nukleáris receptor szupercsaládjába tartozik. A PPAR család felfedezésük kapcsán a peroxisómákról került elnevezésre. A peroxisómákban a hosszú és az elágazó láncú zsírsavak  $\beta$ -oxidáció során rövid zsírsavakra bontódnak. A PPAR család tagjairól először azt figyelték meg, hogy aktiválódásuk hatására megnő a sejtekben a peroxisómák száma, tehát peroxisóma proliferáció játszódik le. Ma már tudjuk, hogy a PPAR család tagjai a sejtek anyagcsere folyamatait szabályozzák, így aktivitásuk a peroxisómákra is kihat [97].

Emlősökben háromféle PPAR található: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  és PPAR $\gamma$ . A PPAR-ok a retinoid X receptorral együtt heterodimert alkotva szabályozzák olyan gének expresszóját, melyeknek a gyulladásban, az anyagcserében és a zsírszövet fejlődésében van szerepük [98]. A hasonlóságok ellenére mindhárom PPAR típus eltérő funkcióval rendelkezik. A PPAR $\alpha$  a zsírsav oxidációt aktiválja, főként májban, szívben és barna zsírszövetben (BAT: brown adipose tissue). A PPAR $\beta/\delta$  minden szövetben expresszálódik és elengedhetetlen szerepe van a zsírsav oxidációban az anyagcsere szempontjából fokozottan aktív szövetekben, mint például a vázizomzat, a szív és a máj. A PPAR $\gamma$  erősen expresszálódik fehér zsírszövetben (WAT: white adipose tissue) és barna zsírszövetben is, amelyekben az adipogenezis fő regulátoraként működik. Emellett a PPAR $\gamma$  az egész szervezet lipid anyagcseréjének és inzulin háztartásának fontos szabályozója [99][100][101]. A PPAR $\gamma$ -nak két izoformája létezik, melyek alternatív splicing során jönnek létre. Míg a PPAR $\gamma$ 1 számos szövetben expresszálódik, addig a 30 aminosavval hosszabb PPAR $\gamma$ 2 expresszója a fiziológias körülmények között a zsírszövetre korlátozódik [101][102].

A PPAR $\gamma$ -t először egy az adipoid differenciálódás során aktiválódó faktorként írták le [101]. Főleg az adipogén és lipogén szignál útvonalak irányítójaként ismert. A PPAR $\gamma$ -null egérenél megfigyelt teljes zsírszöveti hiány is azt támasztja alá, hogy a PPAR $\gamma$  az adipocita differenciálódás nélkülözhetetlen szabályozója [103]. Adipogenezis során a PPAR $\gamma$  korai adipogén transzkripciós faktorokkal működik együtt, mint például: a C/EBP-k [98]. A PPAR $\gamma$  a kifejlődött zsírsejtek megfelelő működéséhez is elengedhetetlen, mert PPAR $\gamma$  gátlás esetén az adipociták csak pár napig életképesek [104]. Ezen túlmenően a PPAR $\gamma$  részt vesz a glükóz háztartás szabályozásában és fokozza a sejtek inzulin szenzitivitását [98][101]. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a PPAR $\gamma$  domináns-negatív mutációval rendelkező embereknél részleges lipodisztrófiát és inzulin rezisztenciát figyeltek meg [105].

A thiazolidinedione-ok (TZD-k) a PPAR $\gamma$  mesterséges agonistái, anti-adipogén és anti-diabetikus hatással rendelkeznek. Korábban a 2-es típusú cukorbetegség kezelésére használtak

a TZD vegyületeket [106]. Alkalmazásuk serkenti a sejtek inzulin-érzékenységét. A cukorbetegség kezelésében elért hatásosságuk ellenére a kardiovaszkuláris mellékhatások miatt használatukat abbahagyták [107]. A PPAR $\gamma$  aktivátorok mellett léteznek gátló szerek is. A PPAR $\gamma$  farmakológiai gátlása bisphenol-a-diglycidyl-etherrel csökkenti a csontvelő elzsírosodását és növeli a csontvelői hematopoetikus őssejtek osztódását [108].

A PPAR $\gamma$ -nak fontos szerepe van számos immunológiailag releváns sejtben, mint például a makrofágokban és az antigén-prezentáló dendritikus sejtekben. A dendritikus sejtekben szabályozza a lipid anyagcserét, az antigén felvételét, az érést, az aktivációt, a migrációt és az antigén prezentációt [109]. A makrofágokban a PPAR $\gamma$  részt vesz a lipid anyagcserében és a gyulladásgátló folyamatokban [110]. Ezen túlmenően PPAR $\gamma$  szerepet játszik az M2 makrofágok érésében, hiányában érésük elmarad [111]. Érdekes módon a vizszerális zsírszövetben található CD4<sup>+</sup> T-sejtek magas PPAR $\gamma$  expressziót mutatnak, míg más szövetekben található CD4<sup>+</sup> T-sejtek esetében PPAR $\gamma$  pozitívitas nem mutatható ki. Ezt a megfigyelést a PPAR $\gamma$  gyulladás-csökkentő szerepével hozzák kapcsolatban, de pontos funkciója még nem tisztázott [112].

## **Lipodisztrófia**

A lipodisztrófiák heterogén elváltozások, melyeket a különböző zsírszövetek hiánya jellemez [113]. A lipodisztrófiákat két fő csoportba sorolhatjuk. Először a szerzett lipodisztrófiás állapotot írták le, majd csak ezután azonosították az öröklött változatot [114]. A lipodisztrófiák által okozott zsírszöveti hiányt három csoportba oszthatjuk. Lokális változatról beszélhetünk, ha a zsírszövet egy kis, jól körül határolt területről hiányzik. A parciális változat esetében a végtagokról hiányzik a zsírszövet, míg a generális változat esetében az egész testet érinti a zsírszöveti hiány. A zsírszövet hiányának mértékétől függően a lipodisztrófiás állapot következtében további szövődmények kialakulhatnak, mint például inzulin rezisztencia, diabétesz, policisztás ovárium, zsírmáj és egyéb anyagcsere betegségek [115].

## **Örökletes lipodisztrófia**

Az örökletes, más néven familiáris lipodisztrófiákat főleg parciális, a végtagokról hiányzó, szubkután zsírszöveti hiány jellemzi. Az ebben az elváltozásban érintettek általában normális zsírszöveti eloszlást mutatnak korai gyermekkorban, a zsírszövet eltűnése a későbbiekben alakul ki. A betegek jellemző a zsírszöveti felhalmozódása a lipodisztrófia által nem érintett testtájakon [116]. A betegség szövődményeként diabétesz és anyagcsere problémák általában csak felnőttkorban fejlődnek ki. A szövődmények által a nők súlyosabban érintettek mint a férfiak [117].

Már több mint 11 kromoszóma régiót azonosítottak, melynek mutációja szerepet játszhat örökletes lipodisztrófia kialakulásában. A genetikai elváltozások között vannak recesszív és domináns mutációk is [114]. Az öröklött lipodisztrófiát kiváltó mutációi közül először az LMNA gén mutációját azonosították. Az LMNA gén a sejtmag lamin fehérjéinek szintézisében vesz részt. Mutációja okozza az FPLD (Familiáris Parciális Lipodisztrófia) II-es típusát (FPLD2) [118]. Az LMNA gén mutációja által kialakuló FPLD2 az örökletes lipodisztrófiák leggyakoribb változata [119]. Az FPLD2 betegekben több anyagcsere betegség is kialakulhat, mint például diabétesz, hyperlipidaemia és hypertriglyceridaemia [120]. A női betegek 25%-nál megtermékenyítési problémáról is beszámoltak [121]. Az LMNA gén mutációja elsősorban az A- és C-típusú lamint érinti. Ennek következtében csökken a maghártya integritása mely hibás sejtmag szerkezetet és korai sejthalált eredményez az adipocitáknál [122]. Az LMNA mutációt követően több egyéb gént is azonosítottak melyek mutációja az FPLD különböző formáihoz vezethetnek, köztük a PPAR $\gamma$ -t is. A PPAR $\gamma$  transzkripciós faktor, nélkülözhetetlen szerepet tölt be az adipocita differenciálódásban, domináns negatív mutációja az FPLD III-as

típusát (FPLD3) eredményezi [123]. Eddig 20 PPAR $\gamma$  mutációt írtak le emberben mely FPLD3 kialakulását eredményezte. Szinte mindegyik mutáció a PPAR $\gamma$  DNS-kötő vagy ligand kötő régiójában található [119]. Az FPLD3 esetében a zsírszöveti hiány a végtagok vége felé erőteljesebb, míg a törzshöz közeli részeken enyhébb. Az arcon, a nyakon és a törzsön zsírszöveti felhalmozódás figyelhető meg [123]. Az FPLD3 leggyakoribb szövődményei az inzulin rezisztencia, a hypertriglyceridaemia és az akut hasnyálmirigy gyulladás [124][125]. AZ FPLD3 ritkábban fordul elő mint az FPLD2, és a kialakuló zsírszöveti hiány is enyhébb, ugyanakkor az anyagcsere zavarok súlyosabbak mint FPLD2 esetében [119] [126].

## Célkitűzések

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

Kutatómunkám célkitűzései a következők voltak:

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

## Anyag és módszer

### Állatok tenyésztése és tartása

A kísérleteinkben C57BL/6J, PPAR $\gamma$  szempontjából háromféle genetikai háttérű (+/+ vad-típusú, +/- heterozigóta, -/- null) törzset alkalmaztunk. A kísérleteink során azonos korú (alomtárs) állatokat használtunk. A PPAR $\gamma$  transzgenikus állatok előállítás Nadra és munkatársai által leírtak szerint történt [127]. Az egereket a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Kísérleti állatházában tenyésztették és tartották, szűrt levegőn, 23-25°C-on, 12 órás sötét-világos ciklusban. Autoklávozott pellet táppal és csapvízzel *ad libitum* voltak ellátva. Tartásuk standard méretű (160x137x330 mm) műanyag ketrecekben, sterilizett almon történt. A kísérletek elvégzéséhez az egereket átszállították a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Immunológiai és Biotechnológiai Intézetének állatházába, ahol az állatokat a korábbi körülményekkel megegyezően tartottuk a kísérletek elvégzéséig. A PPAR $\gamma$  transzgenikus egereket a Debreceni Egyetem engedélyével Debrecenben tenyésztették (TMF/82-10/2015). A kísérletek elvégzése Pécsen a Pécsi Tudományegyetem részére kiállított engedéllyel történt (BA02/2000-46/2016, TMF/124-11/2017).

### Humán tímusz minták

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

### Immunhisztokémia

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

endogén peroxidáz aktivitás blokkolása 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó TBS oldat 15 perces inkubációjával történt. Ezt követően a metszeteket háromszori 0,05% Tween-t tartalmazó TBS oldattal történő mosása után, 3% BSA-t tartalmazó PBS oldattal inkubáltuk 20 percig, majd anti PPAR $\gamma$  antitesttel (nyúl monoklonális antitest klón: C26H12 Cell Signalling Technology) 12 órán keresztül inkubáltuk 4°C-n. Ezután a metszeteket, háromszori TBS oldatban való mosást követően, peroxidáz konjugált anti nyúl antitesttel (kecske poliklonális antitest DAKO) inkubáltuk 90 percig. A jelölés előhívása DAB oldattal (Dako) történt. A magfestéshez hematoxylin festést alkalmaztunk. Végül a metszetek fedését Faramount Aqueous Mounting Medium-al (Dako) végeztük. A metszetek kiértékelését Panoramic MIDI (3DHistech) szkennelvel és ImageJ szoftverrel végeztük. A hematoxylin festés által kéken jelölődő területeket tekintettük sejtes állománynak. A PPAR $\gamma$  pozitív területek barna színnel látszanak a metszeteken. A sejtes állomány és a PPAR $\gamma$  pozitív területek méretének meghatározásához az ImageJ szoftver IHC toolbox [128] bővítményét használtuk.

### **Immunfluoreszcens jelölések**

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

### **Áramlási citometriás mérések**

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

méréshez 100.000 sejtet jelöltünk. A méréseket és az analízist FACSCanto II citométerrel és FASCDiva (Becton Dickinson) szoftverrel végeztük. Minden esetben a morfológiai limfocita kapu alapján 10.000 eseményt rögzítettünk. A timocita alcsoportok meghatározásához CD4-Alexa647 és CD8-FITC antitestet használtunk. A vérben keringő T-sejt alcsoportok vizsgálatához a következő antitesteket használtuk: Becton Dickinson által gyártott fluorofór konjugált monoklonális antitestek: CD3-Pacific Blue (klón: 17A2), CD4-PerCP (klón: GK1.5), CD8-APC/Cy7 (klón: YTS156.7.7), CD44-PE (klón: IM7), CD62L-APC (klón: MEL-14). PTE ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet által gyártott fluorofór konjugált monoklonális antitestek: VD4-Alexa-647 (klón: YTS 191), CD8-FITC (klón: IBL 3/25), CD19-FITC (klón: 1D3).

### **Trec kópiaszám mérés**

A Trec (T cell-recombination excision circle) a T-sejtekben végbemenő génátrendeződés eredményeként keletkezik, jelenléte a perifériára kerülő naiv T-sejtekben is kimutatható. Vizsgálatával megfigyelhetjük a tímusz T-sejt termelő aktivitását [36]. A vizsgálathoz DNS-t izoláltunk egér timocitákból NucleoSpin Tissue kittel (Macherey-Nagel) és humán perifériás vérmintákból DNA Blood Mini kit (Qiagen) használatával. Mindkét esetben a gyártó utasításit követtük. Az abszolút Trec kópiaszámokat digitális PCR technika segítségével határoztuk meg, QuantStudio 3D Digital PCR platform (ThermoFisher) eszköz használatával. A reakciókhoz 30ng DNS mintát használtunk. A Taqman primer próbákat és a reakcióhoz szükséges anyagokat a ThermoFishertől vásároltuk, és a gyártó előírásai szerint használtuk. A humán vérmintákon történt vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ etikai bizottságának engedélyével végeztük (Referencia szám: 6439/2016). A minták forrása: David B. Savage, MD, PhD (Metabolic Research Laboratories, School of Clinical Medicine, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom). Minden résztvevő írásos beleegyezést adott a Helsinkii egyezménynek megfelelően. A vizsgálatokban a 40-60 éves korosztályból férfiak és nők egyaránt részt vettek. Az FPLD2 és FPLD3 lipodisztrófiás állapotot genetikai diagnózissal határozták meg.

### **Orális tolerancia kialakítása egérben**

Az orális tolerancia kialakítását és kiértékelését korábban leírt módszer szerint végeztük [129][130][131]. A vad típusú és a PPAR $\gamma$  haploinsufficiens egerek 5mg/ml ovalbumint (OVA) tartalmazó ívóvizet kaptak 7 napon keresztül. A 7. napon az egereket intraperitoneálisan



beoltottunk 5 $\mu$ g OVA-val (200  $\mu$ l, PBS és komplett Freund-adjuváns 1:1 arányú keverékben oldva). A 14. napon az egereket másodszor is intraperitoneálisan beoltottuk 5 $\mu$ g OVA-val (200  $\mu$ l, PBS és inkomplett Freund-adjuváns 1:1 arányú keverékben oldva). Az egerek szérum mintáit a 21. napon gyűjtöttük össze. Az OVA elleni IgG antitestek mértékét ELISA módszerrel határoztuk meg. A 96 lyukú Microtest Plate-et (Sarstedt) OVA-val vontuk be, és BSA-val blokkoltuk a nem specifikus kötődéseket. A plate-eket az egér szérumok felező hígítási sorozatával (1:100 – 1:3200) inkubáltuk. Az antitest tartalmat HRP konjugált egér immunglobulin ellenes antitesttel (nyúl poliklonális, Dako) jelenítettük meg. Az optikai denzitást 492 nm-en mértük iEMS Reader MF (Thermo LabSystems) plate olvasó segítségével.

### **Influenza vakcináció egérben**

Az influenza oltás hatékonyságának ellenőrzését Ramirez és munkatársai szerint leírtak alapján végeztük [132]. Röviden, 9 hónapos korban mind a vad típusú, mind a PPAR $\gamma$  haploinsufficiens egereket intramuszkulárisan beoltottuk egy alkalommal 0,1 ml humán influenza vakcinával (3Fluart), a humán vakcináció modellezése érdekében (a null egerek rendszerint nem élnek meg ezt a kort, anyagcsere alapbetegség miatt). Majd 3 hónappal később, az egerek 12 hónapos korában megmértük az egerek szérum mintáinak H1N1 (A/California/7/2009-es törzs, melyet a 3Fluart is tartalmaz) elleni antitest tartalmát ELISA módszerrel, hogy megállapítsuk az oltás hatékonyságát. A méréshez az ELISA plate-eket bevontuk 0,05  $\mu$ g a H1N1 influenza A törzs HA fehérjével (Recombinant subtype H1N1 A/California/7/2009 His Tag, Life Technologies). A plate-eket az egér szérumok felező hígítási sorozatával (1:50 – 1:1600) inkubáltuk. Az antitest tartalmat HRP konjugált egér immunglobulin elleni antitest (nyúl poliklonális, Dako) segítségével tettük detektálhatóvá. Az optikai denzitást 492 nm-en mértük iEMS Reader MF (Thermo LabSystems) plate olvasó segítségével.

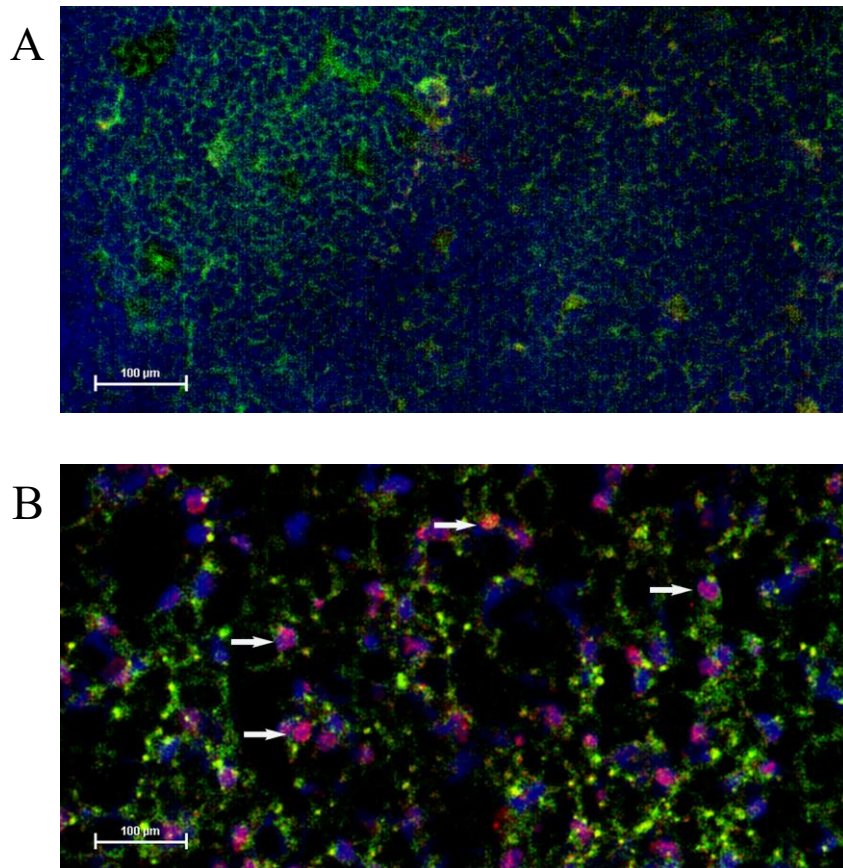
### **Statisztikai analízis**

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

## Eredmények

### A PPAR $\gamma$ expressziójának változása az öregedés során

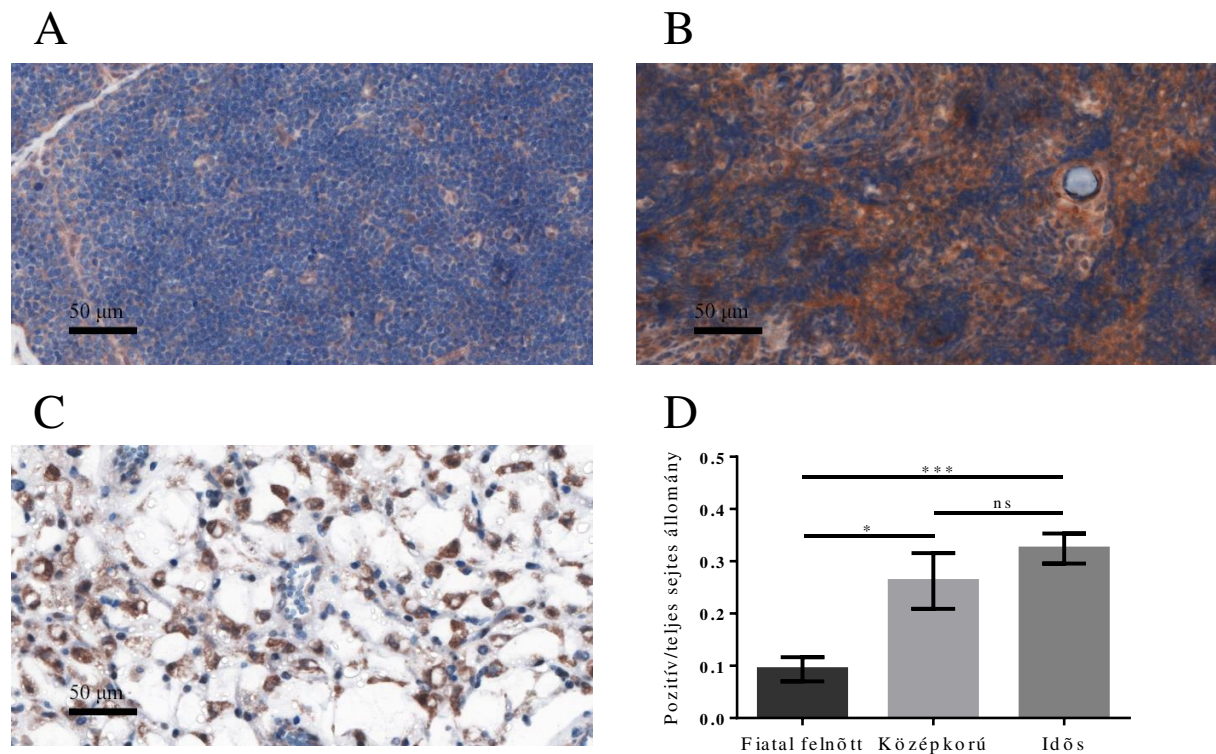
Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy egérben a PPAR $\gamma$  gén expressziós szintje öregedés során emelkedik a tímuszban [70]. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, az öregedés során a PPAR $\gamma$  fehérje szintje is emelkedik-e, fluoreszcens immunhisztokémiai jelölést végeztünk 1 és 15 hónapos egerekből származó tímusz minták metszetein. Vizsgálatainkból megállapítottuk, hogy míg a fiatal egér tímuszában alig detektálható a PPAR $\gamma$  fehérje jelenléte, a felnőtt egér tímuszában a PPAR $\gamma$  erőteljes expressziót mutat (1. ábra). Az idős egerekből származó mintákon megfigyeltük a PPAR $\gamma$  és az EpCAM1 epitél marker együttes expresszióját is ugyanazon sejteken (1./B ábra nyíllal jelölt sejtek). Az együttes expresszió egy köztes állapotra utalhat, ahol a sejtek még mutatnak sejt felszíni epitél jelleget (EpCAM1), de a magban már a zsírsejt irányú transzdifferentiáció is megkezdődött (PPAR $\gamma$ ). Továbbá megfigyelhető a sejtmagok számának jelentős csökkenése is, mely az öregedés során a timociták számának csökkenését mutatja a tímuszban.



**1. ábra: PPAR $\gamma$  fehérje expresszió egér tímuszban**

A PPAR $\gamma$  expressziót immunfluoreszcens jelöléssel vizsgáltuk 1 hónapos (fiatal) (A) és 15 hónapos (idős) (B) egér tímusz metszeteken. Az epitél sejtek zöld színnel festődnek (anti EpCAM1-FITC antitest), a PPAR $\gamma$  piros színnel jelölődik (anti PPAR $\gamma$  elsődleges antitest Alexa-555 konjugált másodlagos antitesttel), a sejtmagok kék színnel láthatóak (DAPI). A jelölődési mintázat az elvártnak megfelelő, az EpCAM1 sejtfelszíni jelölődést mutat, míg a PPAR $\gamma$ a sejtmagban lokalizálódik. Míg egy hónapos korban az epitél sejtek sűrűn helyezkednek el, és PPAR $\gamma$  jelölődés nem látható, addig 15 hónapos korban az EpCAM1<sup>+</sup> sejtek megritkulnak és megnövekedik a PPAR $\gamma$  pozitivitás.

Vizsgáltuk továbbá a PPAR $\gamma$  expressziójának öregedés során bekövetkező változását emberben is. Immunhisztokémiai jelölést végeztünk fiatal, középkorú és idős emberekből származó tímusz mintákon. Azt figyeltük meg, hogy a tímuszban a PPAR $\gamma$  fehérje mennyisége emberben is emelkedik a kor előrehaladtával (2. ábra). Ez a változás szignifikánsnak mutatkozott a fiatal és a középkorú, illetve fiatal és idős emberek tímusz-mintáinak összehasonlítása esetén.

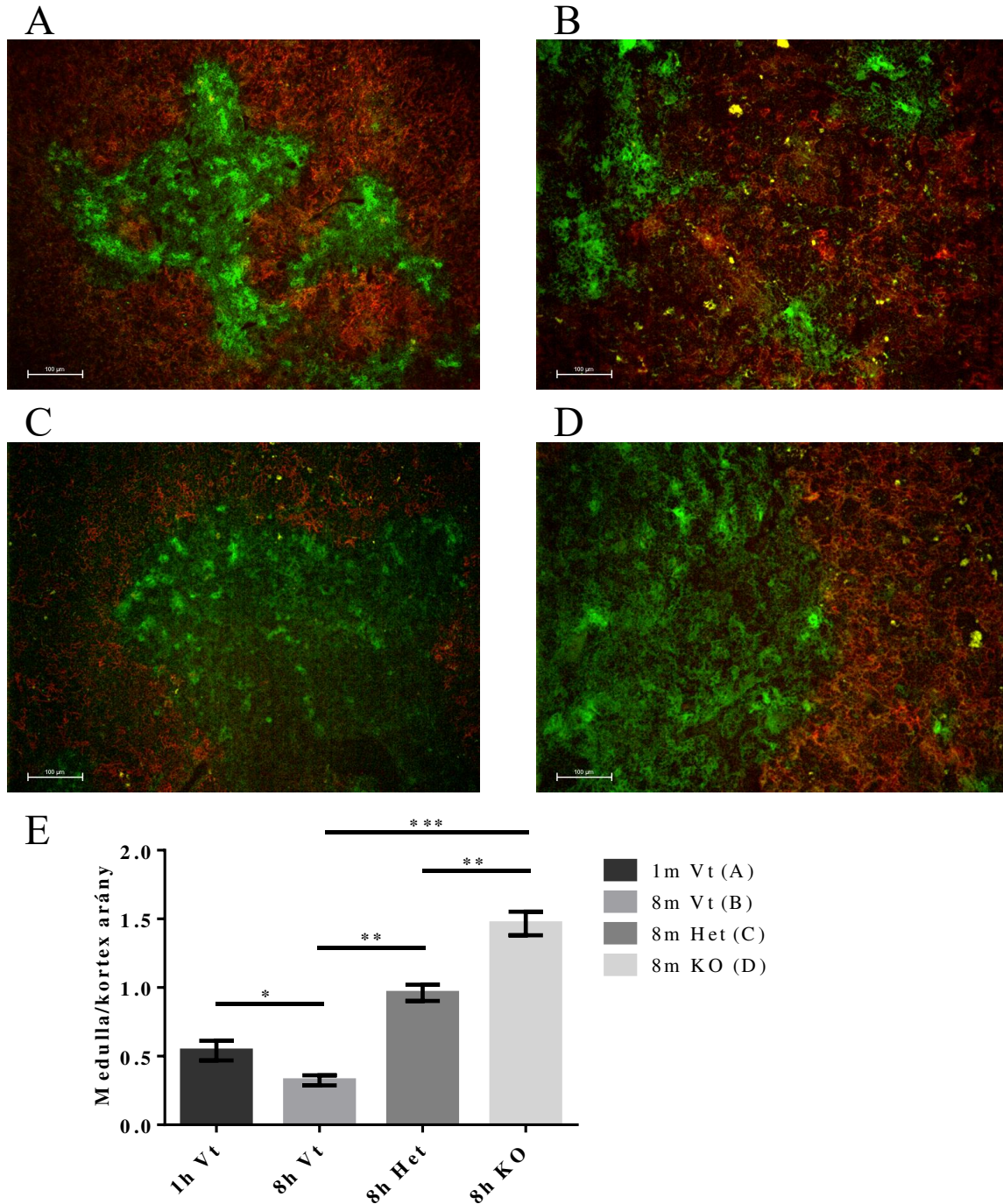


## 2. ábra: PPAR $\gamma$ fehérje expresszió humán tímuszban

*Humán formalin-fixált tímusz metszeteken immunhisztokémiai jelöléssel vizsgáltuk a PPAR $\gamma$  expressziót 20-30 éves (A, fiatal felnőtt), 50-60 éves (B, középkorú) és 70-80 éves (C idős) korban. A PPAR $\gamma$  barna színnel (DAB) jelölődik. A sejtmagok kék színnel (hematoxylin) jelölődnek, mely háttérfestésként szolgál a szöveti állomány megjelenítéséhez. Az A, B és C ábrán egy-egy reprezentatív minta látható az adott korcsoportból. A diagram (D) a PPAR $\gamma$  pozitív és a sejtés állomány arányát mutatja az egyes korcsoportokban.*

## **A PPAR $\gamma$ hatása a tímusz szerkezetére**

Mind egerekben, mind pedig emberekben megfigyelték, hogy az öregedés során a tímusz szerkezete és epitél hálózata felbomlik. A tímusz medulláris állományának aránya lecsökken, mely végül a T-sejt termelés csökkenéséhez vezet [59][55]. Azért, hogy megvizsgáljuk a PPAR $\gamma$ -nak van-e szerepe a tímusz szövettani szerkezetének felbomlásában, összehasonlítottuk a tímusz kortikális és medulláris kompartmentjének arányát vad típusú, PPAR $\gamma$  KO és PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben 1 és 8 hónapos korban (PPAR $\gamma$  KO egerek nem követhetők tovább anyagcsere-betegség miatt). Korábbi mérések szerint a medulláris állomány fokozottan érzékeny regresszióra a kor előrehaladtával [133]. A 3. ábrán immunfluoreszcensen jelölt tímusz metszetek láthatók, a zölden jelölődő területek a medulláris, a piros színnel jelölt területek a kortikális állománynak felelnek meg. Jól látható, hogy míg a vad típusú egerekben a medulla integritása a kor előrehaladtával felbomlik, addig a PPAR $\gamma$  KO és PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben megőrzi integritását. A kéreg és a medulla állomány területét összehasonlítva, míg a vad típusú egereknél a medulla szignifikáns csökkenését figyelhetjük meg, addig a és PPAR $\gamma$  KO egereknél a medulla állomány aránya enyhén növekszik az idő előrehaladtával. A medulla arányának növekedése a PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben is megfigyelhető, bár kisebb mértékben mint a PPAR $\gamma$  KO egereknél (dózishatás).

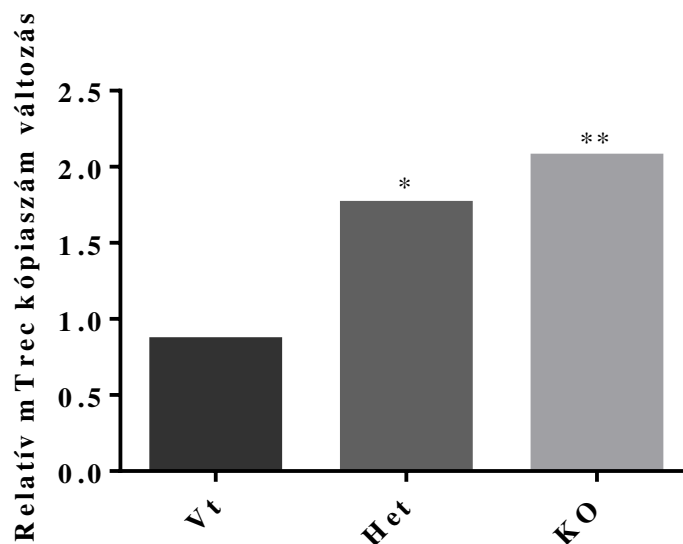


### 3. ábra: Epitél kompartmentek aránya a tímuszban

Egér tímusz metszeteken immunfluoreszcens módszerrel jelöltük a medulláris és kortikális területeket. A medulláris epitél hálózat zöld színnel (anti EpCAM1-FITC<sup>++</sup>), a kortikális epitél hálózat piros színnel (anti Ly51-PE<sup>+</sup>) látható a képeken. A metszetek vad típusú 1 hónapos (A) és 8 hónapos (B) egerekből, valamint 8 hónapos PPAR $\gamma$  heterozigóta (C) és PPAR $\gamma$  KO (D) egerekből származnak. A diagramon (E) a medulla és kortex aránya látható a különböző korcsoportokban.

## A PPAR $\gamma$ hatása tímusz naiv T-sejt termelésre, és a timociták fejlődésére

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, a PPAR $\gamma$  hiánya hatással van-e a tímusz naiv T-sejt termelésére felnőtt korban, megmértük a timociták Trec tartalmát vad, PPAR $\gamma$  heterozigóta és PPAR $\gamma$  KO egerekben 1 és 8 hónapos korban. A Trec a T-sejtekben végbemenő géntrendeződés eredményeként keletkezik, mint DNS melléktermék. Mivel a Trec DNS láncok csak naiv T-sejtekben mutathatók ki, így mennyiségükből jól következtethetünk a tímusz T-sejt termelő aktivitására [36]. Digitális qPCR méréseink kimutatták, hogy a timocitákból izolált Trec kópiaszám szignifikánsan magasabb a PPAR $\gamma$  KO egerekben a vad típusúakhoz képest. Továbbá kimutatható, hogy a PPAR $\gamma$  gén már egy alléljának az elvesztése is a Trec kópiaszám szignifikáns emelkedéséhez vezet (dózishatás) (4. ábra).

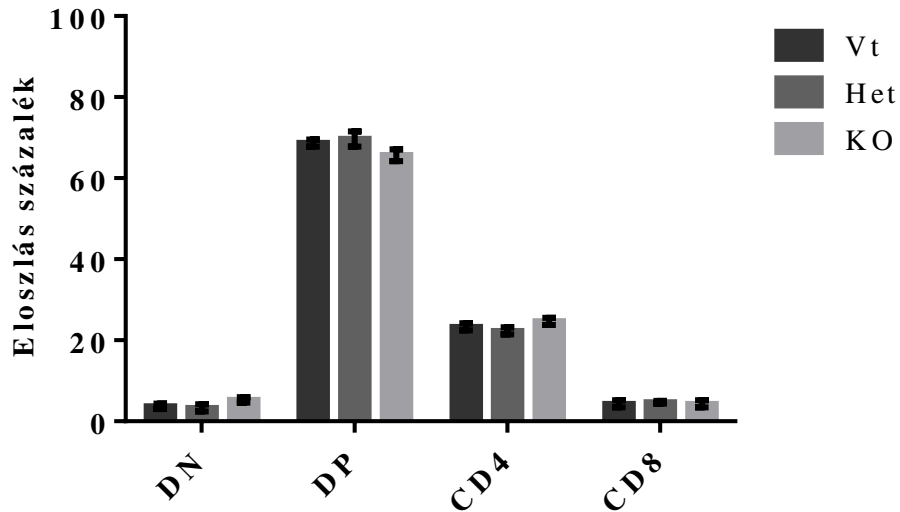


**4. ábra: Naiv T-sejt termelés változása tímuszban**

*Digitális qPCR módszerrel vizsgáltuk a naiv T-sejtekben megtalálható Trec kópiaszámot 1 és 8 hónapos vad típusú, PPAR $\gamma$  heterozigóta és PPAR $\gamma$  KO egerekből izolált timocitákban. A Trec kópiaszám változása összhangban van az újonnan termelődő naiv T-sejtek számával. A diagram a 8 hónapos Trec kópiaszámok arányát mutatja az 1 hónapos egerekből származó minták értékeihez képest.*

Megvizsgáltuk a Trec kópiaszámot és az egerek timocita alcsoportjainak eloszlását annak kiderítésére, hogy a PPAR $\gamma$  hatással van-e a timocita alcsoportok eloszlására. Eredményeinkből jól látszik, hogy míg a PPAR $\gamma$  elvesztése pozitív hatással van a naiv T-sejt termelésre (4. ábra),

nem befolyásolja magát a timocita alcsoportok megoszlását. Megfigyelhető, hogy sem a PPAR $\gamma$  KO, sem a PPAR $\gamma$  heterozigóta egerek timocita eloszlása nem tér el szignifikánsan a vad típusú egerek timocita alcsoport eloszlásától 8 hónapos korban (5. ábra).



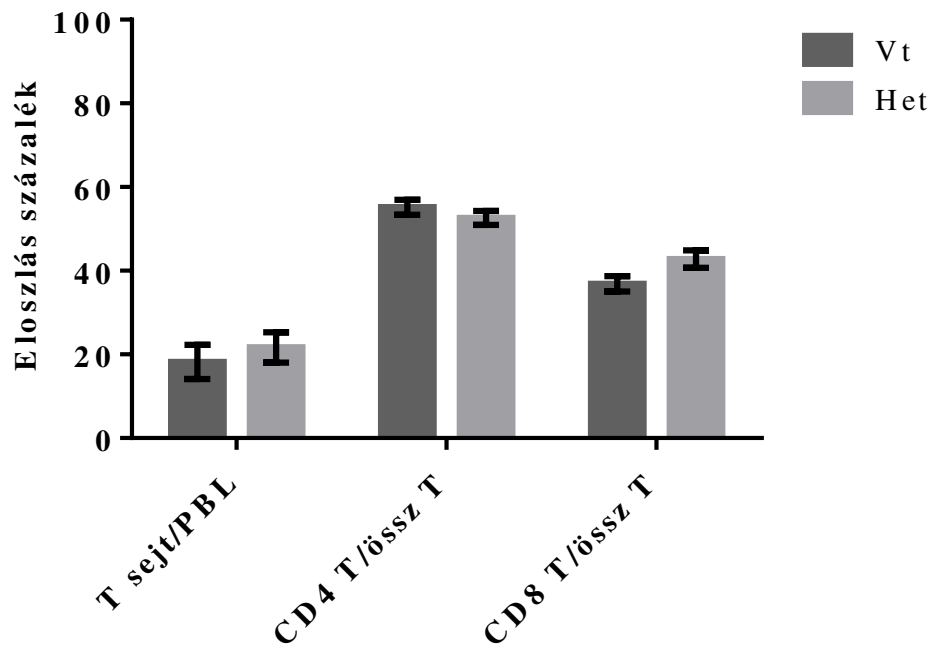
**5. ábra: Timocita alcsoportok aránya**

A timocita alcsoportok arányát áramlási citometriás módszerrel vizsgáltuk 8 hónapos vad típusú, PPAR $\gamma$  heterozigóta és PPAR $\gamma$  KO egerekben. A diagram a kettős negatív (DN, CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>), kettős pozitív (DP, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), CD4 egyszeresen pozitív (CD4, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>) és CD8 egyszeresen pozitív (CD8, CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>) alcsoportok százalékos eloszlását ábrázolja.



## A PPAR $\gamma$ hatása a perifériás T-sejt populációkra felnőtt korban

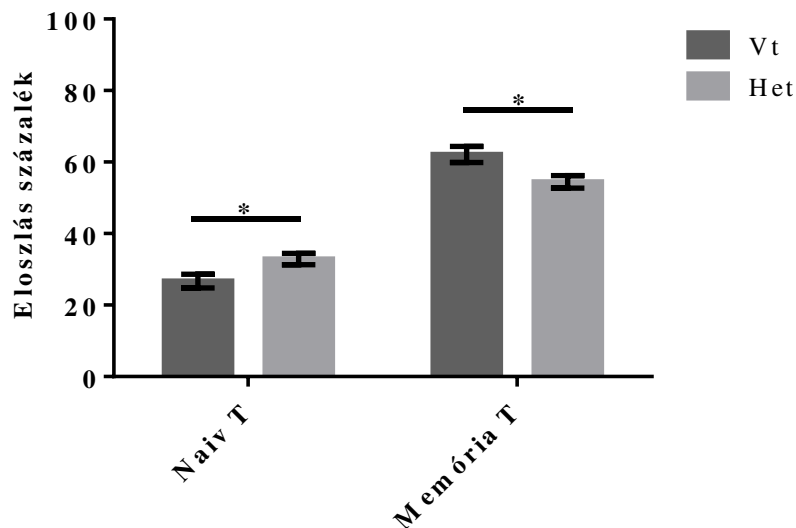
Annak megállapítására, hogy a PPAR $\gamma$  hatással van-e a tímuszon kívül a perifériás immunrendszer sejtjes eloszlására is, a perifériás T-sejt populációkat is megvizsgáltuk. Egy éves vad típusú és PPAR $\gamma$  heterozigóta egerek véreből PBMC-t izoláltunk (ebben a korban a PPAR $\gamma$  KO egerek már nem követhetők, nem életképesek anyagcsere betegségük miatt), a T-sejt populációk eloszlását áramlási citometriás méréssel vizsgáltuk. A 6. ábrán látható, hogy a PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben a T-sejtek aránya a többi vérsejthez képest nem tér el jelentősen a vad típusú egerekéhez képest. Továbbá megfigyelhető, hogy a PPAR $\gamma$  egy alléljának elvesztése nem befolyásolja szignifikánsan a CD4 és CD8 csoportok eloszlását a teljes T-sejt populáción belül.



**6. ábra: Perifériás T-sejt populációk aránya**

A T-sejt csoportok arányát áramlási citometriás módszerrel vizsgáltuk 1 éves vad típusú és PPAR $\gamma$ heterozigóta egerek véreből. A diagram a T-sejtek (CD3<sup>+</sup>) arányát a többi limfocitához képest ábrázolja. A helper T-sejtek (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>) és citotoxikus T-sejtek (CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) százalékos megoszlását a teljes T-sejt populáción belül értelmezve ábrázolja a grafikon.

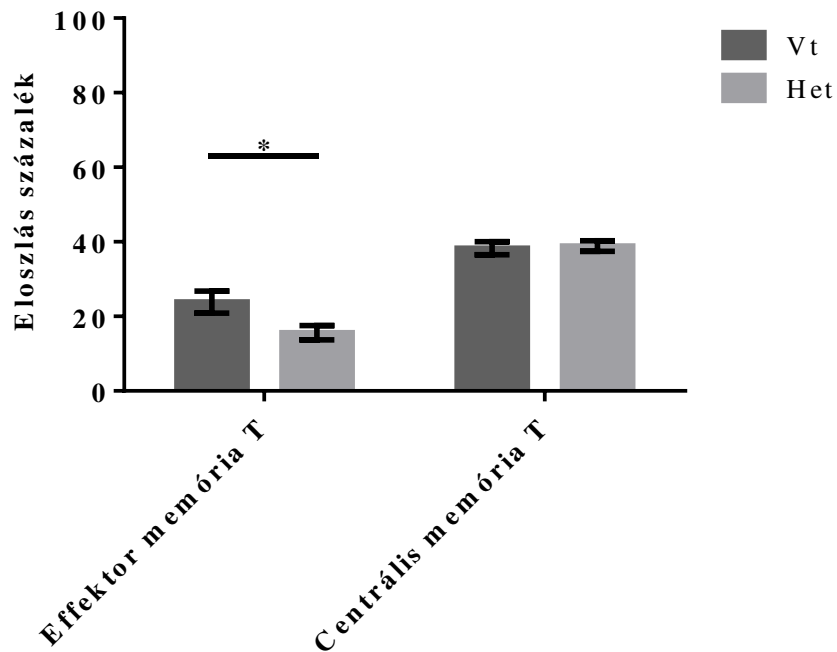
Míg a CD4 és CD8 megoszlásban nem tapasztaltunk jelentős különbséget, addig a naiv és memória T-sejtek arányában szignifikáns különbségek figyelhetők meg a vad típus és a PPAR $\gamma$  heterozigóta egerek között. A naiv T-sejtek aránya szignifikáns emelkedést, míg a memória T-sejtek aránya szignifikáns csökkenést mutat a PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben a vad típushoz képest (7. ábra).



**7. ábra: Naiv és memória T-sejtek megoszlása**

A naiv ( $CD3^+$ ,  $CD44^-$ ,  $CD62L^+$ ) és memória ( $CD3^+$ ,  $CD44^+$ ,  $CD62L^{+/-}$ ) T-sejt csoportok arányát áramlási citometriás módszerrel vizsgáltuk 1 éves vad típusú és PPAR $\gamma$  heterozigóta egerek vérében. A grafikon a naiv és memória T-sejtek teljes T-sejt populáción belüli eloszlását ábrázolja.

A memória T-sejteket tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy az effektor memória T-sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb a PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben. Viszont a centrális memória T-sejtek aránya nem mutat eltérést a vad típushoz képest (8. ábra).

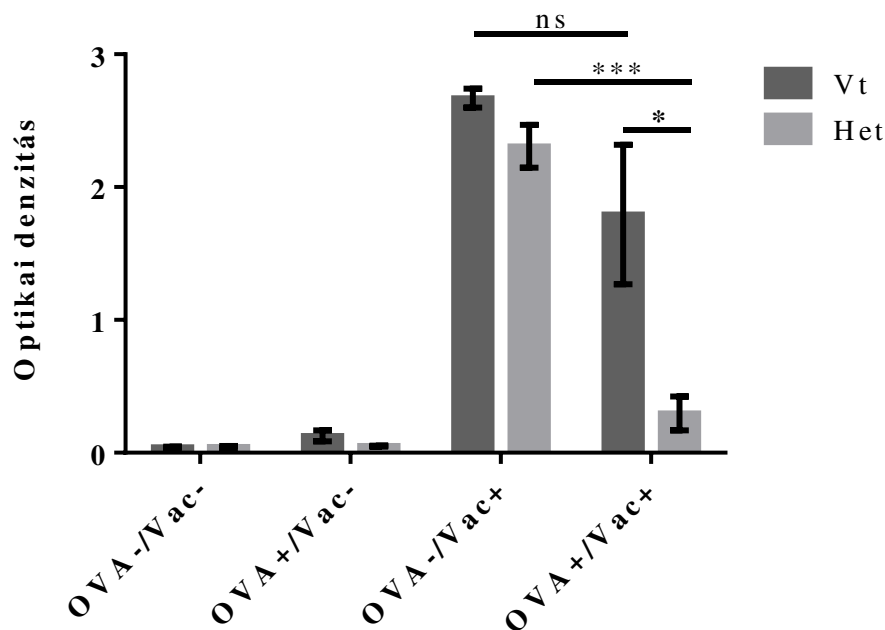


**8. ábra: Memória T-sejt alcsoportok eloszlása**

Az effektor memória ( $CD3^+$ ,  $CD44^+$ ,  $CD62L^-$ ) és centrális memória ( $CD3^+$ ,  $CD44^+$ ,  $CD62L^+$ ) T-sejt csoportok arányát áramlási citometriás módszerrel vizsgáltuk 1 éves vad típusú és PPAR $\gamma$  heterozigóta egerek vérében. A grafikon a memória T-sejt alcsoportok teljes T-sejt populáción belüli eloszlását ábrázolja.

## A PPAR $\gamma$ hatása az immunológiai funkciókra

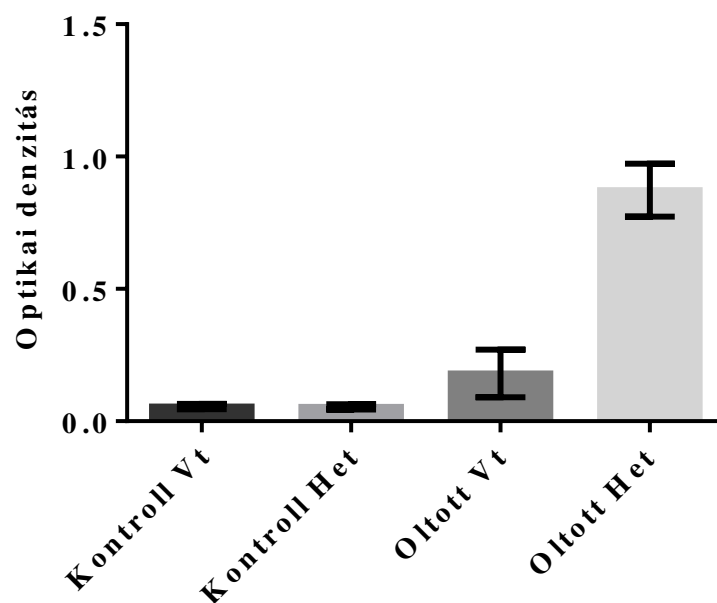
Eredményeink rámutatnak, hogy a PPAR $\gamma$  hiánya hatással van a tímusz öregedésére, és eltéréseket okoz a perifériás T-sejt populációkban felnőtt korban. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a PPAR $\gamma$  hatással van-e az immunológiai funkciókra, további tesztek végeztünk *in vivo* egérmodellen. Irodalmi adatokból ismert, hogy idős korban az orális tolerancia kialakításának képessége jelentősen lecsökken fiatal korhoz képest a csökkenő naiv T-sejt szám miatt [130][131]. Egy éves vad típusú és PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben vizsgáltuk egy testidegen fehérje, az ovalbumin által kiváltott (naiv T-sejteket igénylő) orális tolerancia kialakulását, hogy megvizsgáljuk a PPAR $\gamma$  hiánya hatással van-e az orális tolerancia kialakításának képességére. A 9. ábrán látható eredményeinkből jól látható, hogy az 1 éves vad típusú egérben alig alakult ki orális tolerancia, viszont a PPAR $\gamma$  heterozigóta állatokban erőteljes orális tolerancia alakult ki ovalbumin fehérjére nézve.



9. ábra: Orális tolerancia kialakításának képessége

Az orális tolerancia kialakításának képességét vad típusú és PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben vizsgáltuk 12 hónapos korban ovalbumint használva. Az egerek ovalbumint az itató vizükben (OVA) vagy intraperitoneális injekcióban (Vac) vagy mindkét módon kaptak. Az ovalbumin ellen termelt IgG mennyiséget ELISA módszerrel határoztuk meg. A diagram az ELISA során mért optikai denzitás értékeket ábrázolja.

Az időskori vakcináció nehézségei közismertek T-sejt dependens (naiv T-sejteket igénylő) antigének esetében. A humán influenza oltást modellezve vizsgáltuk, hogy a PPAR $\gamma$  hiánya okoz-e eltérést 1 éves egerek oltási reakciójában. Annak érdekében, hogy minél pontosabban modellezzük az emberi vakcinációt, az egerek esetében nem a szokásos egér-immunizációs protokollt alkalmaztuk (többszöri oltás számos testtájon komplett Freund-adjuvánssal), hanem a humán vakcinációs protokoll szerint jártunk el (egyszeri intramuszkuláris oltás 3Fluart influenza vakcinával). Megfigyelhető, hogy a PPAR $\gamma$  heterozigóta állatokban több antitest termelődött az oltóanyaggal szemben a vad típushoz képest, azonban ez az eltérés statisztikailag nem volt szignifikáns (10. ábra).

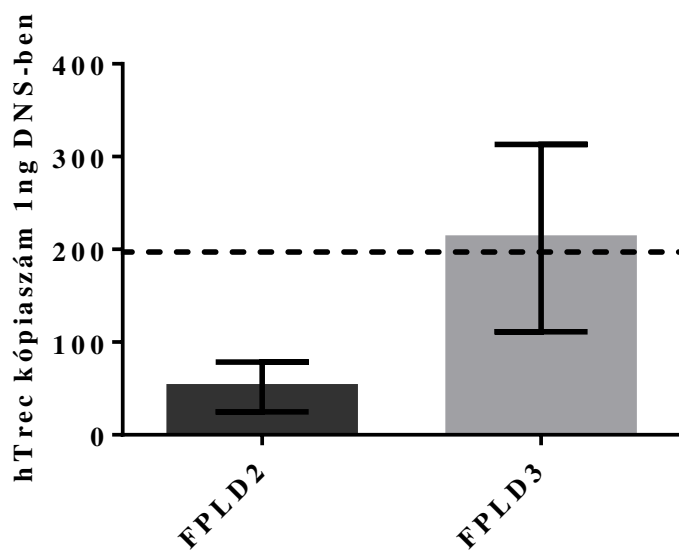


**10. ábra: Vakcinációs hatékonyság idős korban**

*A vad típusú és PPAR $\gamma$  heterozigóta egerek vakcinációs hatékonyságát vizsgáltuk 9 hónapos korban humán influenza oltóanyag felhasználásával. A humán oltóanyag (3Fluart) ellen termelt antitestek mennyiségét az oltás után 3 hónappal mértük ELISA módszerrel. A diagram az ELISA során mért optikai denzitás értékeket ábrázolja.*

## **A PPAR $\gamma$ hiányállapot hatása a humán immunrendszer öregedésére**

A PPAR $\gamma$  hiányállapot egy emberben is létező nagyon ritka (<1/1.000.000) FPLD3 néven ismert (familiáris parciális lipodisztrófia 3-as altípusa) genetikai eredetű anyagcsere betegség. Az emberben kialakuló anyagcsere betegséget lipodisztrófiának nevezik, amely hasonlít a PPAR $\gamma$  KO egerek fenotípusához [134][135][136]. Egy másik, szintén lipodisztrófiát okozó, de eltérő genetikai háttérű ugyancsak nagyon ritka (<1/1.000.000) emberi betegség az FPLD2 (familiáris parciális lipodisztrófia 2-es altípusa), melyben a PPAR $\gamma$  mutáció helyett lamin mutáció felelős ugyanazon anyagcsere betegség kialakulásáért [136]. Az eltérő genetikai háttér ellenére mindkét ritka betegség lipodisztrófiát okoz, azonban ezeknek a tímusz funkciójára gyakorolt hatását még nem vizsgálták. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk van-e eltérés az FPLD2 és FPLD3 betegek naiv T-sejt termelésében, PBMC DNS mintából megmértük a Trec kópiaszámot digitális qPCR módszerrel. Megfigyelhető, hogy a PPAR $\gamma$ -mutáns FPLD3 betegek esetében magasabb a Trec kópiaszám (vagyis a naiv T-sejt termelés), mint a lamin-mutáns FPLD2 betegekben (11. ábra), azonos kor és anyagcsere betegség mellett. A Trec kópiaszám PPAR $\gamma$  érintettség esetében eléri a korcsoport (kb. 50 éves átlagéletkor) normál tartományát (200 kópia/ $\mu$ g DNS), míg lamin-érintettség esetében jóval elmarad ettől, az anyagcsere betegség következtében. (A megfigyelt eltérés nem szignifikáns az egyéni variancia és az alacsony mintaszám (FPLD2 esetében n=3, FPLD3 esetében n=5) miatt. Az elemszám növelésére nincs lehetőségünk a betegségek nagyon ritka elfordulása miatt.)



**11.ábra: Tímusz funkció felnőtt FPLD betegekben**

A humán tímusz funkció vizsgálatához FPLD2 és FPLD3 betegek perifériás vérből izolált leukociták Trec kópia tartalmát mértük digitális qPCR módszerrel. A diagram 1 $\mu$ g DNS-re számított abszolút Trec kópiaszámot ábrázol. A szaggatott vonal az életkornak (átlag kb. 50 év) megfelelő normál Trec tartomány alsó határát jelöli.

## Diszkusszió

Az öregedés az élettel együtt járó természetes folyamat, mely során a szervezet megújuló képessége csökken, a funkciójukat veszített sejtek helyét csökkenő ütemben veszik át újonnan keletkezett megfelelően funkcionáló sejtek, melynek következtében az élettani funkciók hanyatlásnak indulnak. Habár az öregedést nem lehet elkerülni, a modern orvoslásnak és a fejlett társadalmi rendszernek köszönhetően az emberiség várható életkora folyamatosan növekszik [137]. Azért, hogy a hosszabb élettartam ne csak az öregkor meghosszabbítását jelentse, hanem az aktív élettartam megnövekedését is eredményezze, fontosak azok a kutatások, melyeknek célja az öregedés folyamatának megismerése és így az időskori életminőség javítása. A tímusz, más néven csecsemőmirigy az egyik legkorábban öregedésnek induló szerv, emberben és egérben egyaránt. Hanyatlása már gyermekkorban megkezdődik és a pubertáskorban lejátszódó hormonális változásokkal felgyorsul [36]. Mivel a tímusz nélkülözhetetlen szerepet játszik az immunrendszer T-sejtjeinek termelésében és szelekciójában, funkciójának csökkenése komoly következményekkel jár. Az idős korban gyakrabban előforduló fertőzőes megbetegedések, autoimmun betegségek és tumoros elváltozások összefüggést mutatnak a tímusz naiv T-sejt termelő funkciójának csökkenésével [60]. A tímusz öregedésében, a T-sejt fejlődésben közvetlenül szerepet játszó epitél állomány a leginkább érintett. Az idő előrehaladtával az epitél hálózat szerkezete felbomlik, az epitél sejtek száma csökken, helyüket zsírsejtek veszik át. Mivel idős korban a tímusz elzsírosodik és a zsírszövetek megjelenését obligát módon a PPAR $\gamma$  transzkripciós faktor irányítja, ezért vizsgáltuk a PPAR $\gamma$  transzkripciós faktor tímusz öregedésben betöltött szerepét.

A tímusz öregedése során végbemenő génexpressziós változásokat már korábban is vizsgálta csoportunk. Tímusz mintákon kimutattuk, hogy a PPAR $\gamma$  transzkripciós faktor expressziós szintje öregedés során emelkedik [54]. Ezt a megfigyelést, a jelen vizsgálatok is megerősítik. Egér tímusz metszeteken végzett immunfluoreszcens jelöléssel a fiatal, egy hónapos egerek tímuszában a PPAR $\gamma$  jelenléte még nem figyelhető meg, míg a tímusz szempontjából már idős 15 hónapos egerek tímuszában a PPAR $\gamma$  fokozott jelenléte volt megfigyelhető. Továbbá kimutattuk, hogy izolált esetekben ugyanazon sejtek felszínén még epitél marker (EpCAM1), míg magjában már zsírsejt-irányú differenciációra utaló (PPAR $\gamma$ ) marker detektálható. Ez megerősíti korábbi feltételezésünket, hogy az öregedés során a tímusz epitél sejtjei transzdifferentiálódnak zsírsejt irányban, mivel a PPAR $\gamma$  aktivitás a zsírsejt-irányú differenciációt indukálja [103]. Megvizsgáltuk a PPAR $\gamma$  expresszió korfüggését humán tímuszban is. Immunhisztokémiai jelölést használva megfigyeltük, hogy bár a PPAR $\gamma$  jelen van



a fiatal felnőtt (20-30 éves), a középkorú (50-60 éves) és az idős (70-80 éves) humán tímuszban is, a PPAR $\gamma$  expresszió erősödése tapasztalható a kor előrehaladtával a sejtes állományhoz képest. A fiatal felnőtt mintákhoz képest a középkorú és az idős minták szignifikánsan erősebb PPAR $\gamma$  jelenlétet mutattak. (Az időskori mintákban már nem volt további szignifikáns emelkedés a PPAR $\gamma$  expressziójában a középkorú mintákhoz képest).

A PPAR $\gamma$ -val kapcsolatos tanulmányok közt több olyan eredmény is született, mely összefüggést talált a fokozott PPAR $\gamma$  aktivitás és a csökkent tímusz funkció között. Beszámolnak arról, hogy a PPAR $\gamma$ -t aktiváló szteroid alapú gyógyszerkészítmények, vagy a PPAR $\gamma$  agonista TZD-alapú gyógyszerek a tímusz fokozott elzsírosodását okozhatják, ezáltal az immunológiai funkciók csökkenését eredményezhetik. Valamint kimutatták, hogy a PPAR $\gamma$  fokozott expressziója felgyorsítja a tímusz öregedését [95]. Ezek az eredmények összhangban vannak az általunk megfigyelt, öregedéssel együtt járó PPAR $\gamma$  expresszió növekedéssel (1. és 2. ábra). Ezen eredmények azt sugallják, hogy a PPAR $\gamma$  aktív szereppel bír a tímusz öregedésének mechanizmusában. Mivel a PPAR $\gamma$  fokozott expressziójának hatása már ismert, de hiányának hatását még nem vizsgálták a tímusz szempontjából, így a tímusz öregedését PPAR $\gamma$  hiányállapotos egerekben és emberekben is megvizsgáltuk.

A tímusz szövettani szerkezetét vizsgálva megfigyeltük, hogy vad típusú egérben 8 hónapos korra, mely a tímusz öregedése szempontjából már számottevő kor, a kortikális és medulláris területek aránya megváltozik, az epitél sejtek hálózatának felbomlása megkezdődik (3./A-B ábra). Ezek a degeneratív elváltozások a génhányos PPAR $\gamma$  KO, illetve PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben nem következnek be (3./C-D ábra). Annak tisztázására, hogy a PPAR $\gamma$  hiánya a tímusz szerkezetének megőrzése mellett a tímusz funkciójára is hatással van-e, megvizsgáltuk a naiv T-sejt termelést Trec digitális qPCR módszerrel. A Trec kópiák olyan cirkuláris DNS molekulák, melyek a T-sejtekben lezajló TCR génátrendeződés melléktermékeként keletkeznek, mennyiségük arányos a naiv T-sejt termelés mértékével. Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy míg vad típusú egérben 8 hónapos korra enyhe csökkenés figyelhető meg a Trec kópiaszámában, addig a PPAR $\gamma$  KO és heterozigóta egerekben a Trec kópiaszám szignifikánsan magasabb az 1 hónapos kontroll egerekben mért értékekhez képest, dóziszfüggő mértékben (4. ábra). A timocita alcsoportok CD4/CD8 megoszlásának vizsgálatával megfigyeltük, hogy a timocita alcsoportok eloszlását tekintve sem a PPAR $\gamma$  KO, sem a PPAR $\gamma$  heterozigóta minták nem mutatnak eltérést a vad típushoz képest (5. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a PPAR $\gamma$  hiánya, bár megnöveli a keletkező naiv T-sejtek számát, de a timociták fejlődésének irányát nem befolyásolja, az alcsoportok megoszlását nem torzítja.

A fenti eredményeink alapján a PPAR $\gamma$  funkció elvesztése pozitív hatással van a tímusz szerkezetére és naiv T-sejt termelésére öregedés során. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy ez a hatás nem csak a gén teljes hiányában, hanem már egy alléljának elvesztésével is megfigyelhető (dózishatás). A PPAR $\gamma$  teljes hiánya azonban súlyos anyagcsere betegségekhez vezet egér esetében [127]. Ennek következtében a PPAR $\gamma$  KO egerek hosszú távú követése nem kivitelezhető (10 hónapon túl). Ezek a súlyos anyagcsere elváltozások azonban a PPAR $\gamma$  heterozigóta egereknél nem figyelhetők meg. Mivel a PPAR $\gamma$  heterozigóta egereket nem érinti a PPAR $\gamma$  hiányának élettartamot és anyagcserét befolyásoló negatív hatási, viszont a tímuszra gyakorolt pozitív hatás kimutatható volt, további kísérleteinket idősebb korban ezekkel az állatokkal végeztük.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a fokozott tímusz funkció (naiv T-sejt termelés) következményekkel jár-e a perifériás immunrendszerre nézve, összehasonlítottuk 12 hónapos vad típusú és PPAR $\gamma$  heterozigóta egerek vérében keringő T-sejt alcsoportok arányát. Kimutattuk, hogy a T-sejtek aránya nem változik a többi limfocita típushoz képest, valamint a CD4 és CD8 T-sejtek aránya sem változik a perifériás vérben (6. ábra). Korábbi tanulmányok leírták, hogy öregedés során a naiv T-sejtek aránya csökken a memória T-sejtek aránya viszont emelkedik [60][138]. Részben a naiv T-sejtek arányának csökkenése felelős az idős korban megfigyelt, gyengébb immunológiai válaszokért [60][139][140]. Mivel a PPAR $\gamma$  hiánya pozitív hatással van a tímusz naiv T-sejt termelésére, megvizsgáltuk, hogy ez hatással van-e a naiv T-sejtek arányára a perifériás vérben. Megfigyeltük, hogy 12 hónapos PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben a naiv T-sejtek aránya szignifikánsan magasabb, mint a memória T-sejtek aránya, szemben vad típusú egerekben mért értékekkel (7. ábra). A memória T-sejt populációt tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy míg a centrális memória T-sejtek aránya nem változik, addig az effektor memória T-sejtek aránya alacsonyabb a PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben a vad típushoz képest (8. ábra).

Az eddig bemutatott eredmények alapján a PPAR $\gamma$  hiánya késlelteti a tímusz epitél állományának öregedését, pozitív hatással van a naiv T-sejt termelésre és a perifériás vérben megnöveli a naiv T-sejtek arányát. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy idősebb korban a naiv T-sejt függő immunológiai funkciók aktívabbak maradnak a PPAR $\gamma$  génhányos egerekben, mint kontroll társaikban. Annak érdekében, hogy ezt a feltevést megvizsgáljuk, az orális tolerancia kialakulásának készségét és egy humán oltóanyag hatékonyságát vizsgáltuk 12 hónapos vad típusú és PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben. Mind a két folyamat naiv T-sejt függő, valamint korábbi tanulmányok kimutatták, hogy idősebb korban csökken az oltások hatékonysága és orális (étel)-intolerancia is gyakrabban alakul ki [141][130]. Kimutattuk, hogy

míg 12 hónapos korban a vad típusú egérben alig alakul ki orális tolerancia (bár ez fiatal korban könnyen kialakítható [131]), addig a PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben az orális tolerancia könnyedén kialakul még idősebb korban is (9. ábra). Továbbá az influenza oltás hatékonysága is megmarad idősebb PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben, míg vad típus esetében ez jelentősen gyengébb (10. ábra). Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a tímuszra és azon belül a naiv T-sejt termelésre gyakorolt kedvező hatása révén a PPAR $\gamma$  hiánya pozitív hatással van a T-sejt függő immunológiai funkciókra idősebb korban.

Egér modellen kimutatott eredményeink humán vonatkozásait is megvizsgáltuk. A PPAR $\gamma$  génhiányos állapot, mint III-as típusú familiáris parciális lipodisztrófia, ismert ritka betegség (1/1.000.000) emberben is. Bár a betegség által okozott súlyos anyagcsere problémákat több klinikai kutatás is kimutatta [124][125], a PPAR $\gamma$  hiányállapot immunrendszerre gyakorolt hatását azonban még nem vizsgálták. Mivel a járulékos anyagcsere problémák is csökkent immunológiai funkciókhoz vezethetnek és középkorú (már nem fiatal) betegekről van szó, eredményeinket a hasonló korú és hasonló anyagcsere problémákat eredményező, de a PPAR $\gamma$ -t nem érintő lamin mutáción alapuló FPLD2 betegségben [118] szenvedő emberekhez hasonlítottuk. Megfigyeltük, hogy FPLD3 betegek vérében magasabb a Trec kópiaszám, mint a korban és betegségben megegyező FPLD2 betegek esetében, és megfelel az életkor alapján várható értéknek (11. ábra). Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az emberi PPAR $\gamma$  hiányállapot az egerekhez hasonlóan pozitív hatással van a tímusz funkcióra idősebb korban.

Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a PPAR $\gamma$  hiánya egerekben késlelteti a tímusz öregedését. A PPAR $\gamma$  gén már egy alléljának hiánya is azt eredményezi, hogy a tímusz epitél hálózatának felbomlása később kezdődik meg vad típusú egerekhez képest. A jelenség pozitív következménye a fokozott naiv T-sejt termelés és a hatékonyabb T-sejt függő immunológiai funkció PPAR $\gamma$  génhiányos egerekben. Ezt a pozitív hatást humán vonatkozásban is sikerült igazolni PPAR $\gamma$  hiányállapotú betegeknél. Bár a PPAR $\gamma$  hiányállapot az immunrendszerre pozitív hatást gyakorol, ennek ellenére súlyos anyagcsere problémákat is okoz, ami miatt a szisztémás PPAR $\gamma$  gátlás nem lenne alkalmazható a tímusz öregedésének késleltetése érdekében. Ezért további célunk olyan mechanizmus azonosítása, mely genetikai (szisztémás) hatás helyett célzottan a tímusz epitélre kifejtett PPAR $\gamma$  antagonistá hatást közvetítene. Jelen tudásunk és párhuzamos kutatási eredményeink alapján céljainkra mesterséges nanorészecskék vagy természetes exoszómák lehetnek alkalmasak, de ennek részletezése túlmutat a jelen dolgozaton.

## Új eredmények összefoglalása

1. Kimutattuk, hogy PPAR $\gamma$  génhiányos egerekben a tímusz szerkezetének öregedéssel együtt járó változásai később játszódnak le a vad típushoz képest. Azt is megfigyeltük, hogy ez a késleltetés dóziszfüggő, már a PPAR $\gamma$  egyetlen alléljának hiányában is végbemegy, nem csak a PPAR $\gamma$  teljes hiányában.
2. Bebizonyítottuk, hogy a PPAR $\gamma$  hiánya hatással van a naiv T-sejt termelésre. Nyolc hónapos korban jelentősen magasabb volt a naiv T-sejt termelés PPAR $\gamma$  génhiányos egerekben, mint vad típusú társaikban. Megfigyeltük, hogy ez a jelenség szintén dóziszfüggő, mivel a PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben a T-sejt termelés magasabb volt a vad típusnál, de alacsonyabb a PPAR $\gamma$  KO egereknél.
3. Megfigyeltük, hogy egereknél a tímusz szempontjából idősnek számító egy éves korban a PPAR $\gamma$  hiánya befolyásolja a naiv T-sejtek arányát perifériás vérben. A naiv T-sejt/memória T-sejt arány a naiv T-sejtek javára tolódik el a PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben vad típusú társaikhoz viszonyítva.
4. A naiv T-sejtek arányának növekedése hatást gyakorol a T-sejt függő immunológiai funkciókra. *In vivo* kísérletekkel kimutattuk, hogy az orális tolerancia kialakulása, valamint a vakcinálhatóság fokozott hatékonysággal ment végbe egy éves PPAR $\gamma$  heterozigóta egerekben, vad típusú társaikhoz képest.
5. Végül bizonyítást nyert, hogy az immunrendszer, azon belül is a tímusz öregedéséről egér modellben nyert eredményeink humán jelentőséggel is bírnak. A ritka spontán PPAR $\gamma$  hiányállapottal (FPLD3 betegség) rendelkező betegek esetében felnőtt korban fokozottabb a tímusz funkciója (naiv T-sejt termelés), mint azonos korú és betegségű egyéb genetikai háttérrel rendelkező betegek esetében (FPLD2 betegség, lamin hiányállapot következtében).

## Irodalomjegyzék

- [1] G. Pearse, “Normal Structure, Function and Histology of the Thymus,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 34, no. 5, pp. 504–514, 2006.
- [2] X. Jiang, D. H. Rowitch, P. Soriano, A. P. McMahon, and H. M. Sucov, “Fate of the mammalian cardiac neural crest,” *Development*, vol. 127, no. 8, pp. 1607–1616, 2000.
- [3] M. Itoi, H. Kawamoto, Y. Katsura, and T. Amagai, “Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage,” *Int. Immunol.*, vol. 13, no. 9, pp. 1203–1211, 2001.
- [4] S. W. Rossi, W. E. Jenkinson, G. Anderson, and E. J. Jenkinson, “Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium,” *Nature*, vol. 441, no. 7096, pp. 988–991, 2006.
- [5] D. E. Bockman and M. L. Kirby, “Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest,” *Science (80-. )*, vol. 223, no. 4635, pp. 498–500, 1984.
- [6] W. E. Jenkinson, E. J. Jenkinson, and G. Anderson, “Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors,” *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 2, pp. 325–332, 2003.
- [7] W. E. Jenkinson, S. W. Rossi, S. M. Parnell, E. J. Jenkinson, and G. Anderson, “PDGFR $\alpha$ -expressing mesenchyme regulates thymus growth and the availability of intrathymic niches,” *Blood*, vol. 109, no. 3, pp. 954–960, 2007.
- [8] D. H. D. Gray, N. Seach, T. Ueno, M. K. Milton, A. Liston, A. M. Lew, C. C. Goodnow, and R. L. Boyd, “Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells,” *Blood*, vol. 108, no. 12, pp. 3777–3785, 2006.
- [9] W. van Ewijk, E. W. Shores, and A. Singer, “Crosstalk in the mouse thymus,” *Trends Immunol.*, vol. 15, no. 5, pp. 214–217, 1994.
- [10] I. Ohigashi, M. Kozai, and Y. Takahama, “Development and developmental potential of cortical thymic epithelial cells,” *Immunol. Rev.*, vol. 271, no. 1, pp. 10–22, 2016.
- [11] M. Nehls, D. Pfeifer, M. Schorpp, H. Hedrich, and T. Boehm, “New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations,” *Nature*, vol. 372, no. 6501, pp. 103–107, 1994.
- [12] H. Takaba and H. Takayanagi, “The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus,” *Trends in Immunology*, vol. 38, no. 11, pp. 805–816, 2017.
- [13] K. A. Hogquist, T. A. Baldwin, and S. C. Jameson, “Central tolerance: Learning self-control in the thymus,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 5, no. 10, pp. 772–782, 2005.
- [14] S. W. Rossi, M.-Y. Kim, A. Leibbrandt, S. M. Parnell, W. E. Jenkinson, S. H. Glanville, F. M. McConnell, H. S. Scott, J. M. Penninger, E. J. Jenkinson, P. J. L. Lane, and G. Anderson, “RANK signals from CD4<sup>+</sup>3<sup>-</sup> inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla,” *J. Exp. Med.*,

vol. 204, no. 6, pp. 1267–1272, 2007.

- [15] Z. Pancer and M. D. Cooper, “THE EVOLUTION OF ADAPTIVE IMMUNITY,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 24, no. 1, pp. 497–518, 2006.
- [16] L. Klein, B. Kyewski, P. M. Allen, and K. A. Hogquist, “Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don’t see),” *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, no. 6, pp. 377–391, 2014.
- [17] E. F. Lind, S. E. Prockop, H. E. Porritt, and H. T. Petrie, “Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development.,” *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 2, pp. 127–134, 2001.
- [18] J. C. Zúñiga-Pflücker, “When three negatives made a positive influence in defining four early steps in T cell development.,” *J. Immunol.*, vol. 189, no. 9, pp. 4201–2, Nov. 2012.
- [19] M. Ciofani and J. C. Zúñiga-Pflücker, “The Thymus as an Inductive Site for T Lymphopoiesis,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 463–493, 2007.
- [20] T. Hara, S. Shitara, K. Imai, H. Miyachi, S. Kitano, H. Yao, S. Tani-ichi, and K. Ikuta, “Identification of IL-7-Producing Cells in Primary and Secondary Lymphoid Organs Using IL-7-GFP Knock-In Mice,” *J. Immunol.*, vol. 189, no. 4, pp. 1577–1584, 2012.
- [21] K. Hozumi, C. Mailhos, N. Negishi, K. Hirano, T. Yahata, K. Ando, S. Zuklys, G. A. Holländer, D. T. Shima, and S. Habu, “Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development,” *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 11, pp. 2507–2513, 2008.
- [22] M. Ciofani and J. C. Zúñiga-Pflücker, “Determining  $\gamma\delta$  versus  $\alpha\beta$  T cell development (mouse),” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 9, pp. 657–663, 2010.
- [23] H. R. MacDonald, R. C. Budd, and R. C. Howe, “A CD3- subset of CD4-8+ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of CD4+8+ cells.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 18, pp. 519–523, 1988.
- [24] A. Singer, S. Adoro, and J. H. Park, “Lineage fate and intense debate: Myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 10, pp. 788–801, 2008.
- [25] S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, S. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, and K. Tanaka, “Regulation of CD8+ T Cell Development by Thymus-Specific Proteasomes,” *Science (80-. )*, vol. 316, no. 5829, pp. 1349–1353, 2007.
- [26] K. Takada and Y. Takahama, “Positive-selection-inducing self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells,” *Adv. Immunol.*, vol. 125, no. 1, pp. 87–110, 2015.
- [27] G. Anderson and Y. Takahama, “Thymic epithelial cells: Working class heroes for T cell development and repertoire selection,” *Trends in Immunology*, vol. 33, no. 6, pp. 256–263, 2012.

- [28] R. Förster, A. C. Davalos-Misslitz, and A. Rot, “CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 5. pp. 362–371, 2008.
- [29] C. St-Pierre, A. Trofimov, S. Brochu, S. Lemieux, and C. Perreault, “Differential Features of AIRE-Induced and AIRE-Independent Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells,” *J. Immunol.*, vol. 195, no. 2, pp. 498–506, 2015.
- [30] F. X. Hubert, S. A. Kinkel, G. M. Davey, B. Phipson, S. N. Mueller, A. Liston, A. I. Proietto, P. Z. F. Cannon, S. Forehan, G. K. Smyth, L. Wu, C. C. Goodnow, F. R. Carbone, H. S. Scott, and W. R. Heath, “Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance,” *Blood*, vol. 118, no. 9, pp. 2462–2472, 2011.
- [31] S. Sakaguchi, “Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance,” *Cell*, vol. 101, no. 5. pp. 455–458, 2000.
- [32] W. W. Thompson, D. K. Shay, E. Weintraub, N. Cox, L. J. Anderson, and K. Fukuda, “Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States,” *J. Am. Med. Assoc.*, 2003.
- [33] J. M. Lord, “The effect of aging of the immune system on vaccination responses,” *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2013.
- [34] E. Montecino-Rodriguez, B. Berent-Maoz, and K. Dorshkind, “Causes, consequences, and reversal of immune system aging,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, no. 3. pp. 958–965, 2013.
- [35] D. J. Rossi, D. Bryder, J. M. Zahn, H. Ahlenius, R. Sonu, A. J. Wagers, and I. L. Weissman, “Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005.
- [36] H. E. Lynch, G. L. Goldberg, A. Chidgey, M. R. M. Van den Brink, R. Boyd, and G. D. Sempowski, “Thymic involution and immune reconstitution.,” *Trends Immunol.*, vol. 30, no. 7, pp. 366–73, Jul. 2009.
- [37] W. W. Pang, E. A. Price, D. Sahoo, I. Beerman, W. J. Maloney, D. J. Rossi, S. L. Schrier, and I. L. Weissman, “Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011.
- [38] B. Dykstra, S. Olthof, J. Schreuder, M. Ritsema, and G. de Haan, “Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells,” *J. Exp. Med.*, 2011.
- [39] R. Solana, R. Tarazona, I. Gayoso, O. Lesur, G. Dupuis, and T. Fulop, “Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans,” *Seminars in Immunology*. 2012.
- [40] J. P. Miller and D. Allman, “The Decline in B Lymphopoiesis in Aged Mice Reflects Loss of Very Early B-Lineage Precursors,” *J. Immunol.*, 2003.
- [41] H. Min, E. Montecino-Rodriguez, and K. Dorshkind, “Reduction in the Developmental

- Potential of Intrathymic T Cell Progenitors with Age,” *J. Immunol.*, 2004.
- [42] D. Frasca and B. B. Blomberg, “Effects of aging on B cell function,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 21, no. 4, pp. 425–430, Aug. 2009.
- [43] S. Sasaki, M. Sullivan, C. F. Narvaez, T. H. Holmes, D. Furman, N. Y. Zheng, M. Nishtala, J. Wrammert, K. Smith, J. A. James, C. L. Dekker, M. M. Davis, P. C. Wilson, H. B. Greenberg, and X. S. He, “Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies,” *J. Clin. Invest.*, 2011.
- [44] M. Prelog, “Aging of the immune system: A risk factor for autoimmunity?,” in *Autoimmunity Reviews*, 2006.
- [45] M. Bulati, S. Buffa, G. Candore, C. Caruso, D. K. Dunn-Walters, M. Pellicanò, Y. C. Wu, and G. Colonna Romano, “B cells and immunosenescence: A focus on IgG+IgD-CD27-(DN) B cells in aged humans,” *Ageing Research Reviews*. 2011.
- [46] F. F. Fagnoni, R. Vescovini, G. Passeri, G. Bologna, M. Pedrazzoni, G. Lavagetto, A. Casti, C. Franceschi, M. Passeri, and P. Sansoni, “Shortage of circulating naive CD8+ T cells provides new insights on immunodeficiency in aging,” *Blood*, 2000.
- [47] E. FUENTES, M. FUENTES, M. ALARCÓN, I. PALOMO, E. FUENTES, M. FUENTES, M. ALARCÓN, and I. PALOMO, “Immune System Dysfunction in the Elderly,” *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 89, no. 1, pp. 285–299, Mar. 2017.
- [48] K. G. Flores, J. Li, G. D. Sempowski, B. F. Haynes, and L. P. Hale, “Analysis of the human thymic perivascular space during aging,” *J. Clin. Invest.*, vol. 104, no. 8, pp. 1031–1039, 1999.
- [49] H. Yang, Y.-H. Youm, Y. Sun, J.-S. Rim, C. J. Galbán, B. Vandanmagsar, and V. D. Dixit, “Axin expression in thymic stromal cells contributes to an age-related increase in thymic adiposity and is associated with reduced thymopoiesis independently of ghrelin signaling,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 85, no. 6, pp. 928–38, Jun. 2009.
- [50] G. G. STEINMANN, B. KLAUS, and H. -K MÜLLER-HERMELINK, “The Involution of the Ageing Human Thymic Epithelium is Independent of Puberty: A Morphometric Study,” *Scand. J. Immunol.*, vol. 22, no. 5, pp. 563–575, 1985.
- [51] R. A. Miller, “The Aging Immune System: Primer and Prospectus,” *Science (80-. )*, vol. 273, no. 5271, pp. 70–74, 1996.
- [52] B. F. Haynes, M. L. Markert, G. D. Sempowski, D. D. Patel, and L. P. Hale, “The Role of the Thymus in Immune Reconstitution in Aging, Bone Marrow Transplantation, and HIV-1 Infection,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 18, no. 1, pp. 529–560, 2000.
- [53] N. R. Manley, E. Richie, C. C. Blackburn, B. G. Condie, and J. Sage, “Structure and function of the thymic microenvironment,” *Front. Biosci.*, vol. 17, no. June, pp. 2461–2477, 2011.
- [54] H. Yang, Y.-H. Y.-H. Youm, and V. D. Dixit, “Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution,” *J.*



*Immunol.*, vol. 183, no. 5, pp. 3040–3052, Sep. 2009.

- [55] A. V. Griffith, M. Fallahi, T. Venables, and H. T. Petrie, “Persistent degenerative changes in thymic organ function revealed by an inducible model of organ regrowth,” *Aging Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 169–177, 2012.
- [56] K. Foster, J. Sheridan, H. Veiga-Fernandes, K. Roderick, V. Pachnis, R. Adams, C. Blackburn, D. Kioussis, and M. Coles, “Contribution of Neural Crest-Derived Cells in the Embryonic and Adult Thymus,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 5, pp. 3183–3189, 2008.
- [57] V. D. M. Coelho, A. Bunbury, L. B. Rangel, B. Giri, A. Weeraratna, P. J. Morin, M. Bernier, and D. D. Taub, “Fat-storing multilocular cells expressing CCR5 increase in the thymus with advancing age: Potential role for CCR5 ligands on the differentiation and migration of preadipocytes,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–14, 2010.
- [58] Y. H. Youm, H. Yang, Y. Sun, R. G. Smith, N. R. Manley, B. Vandanmagsar, and V. D. Dixit, “Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 11, pp. 7068–7077, Mar. 2009.
- [59] D. D. Taub and D. L. Longo, “Insights into thymic aging and regeneration,” *Immunological Reviews*, vol. 205, pp. 72–93, 2005.
- [60] K. Naylor, G. Li, A. N. Vallejo, W.-W. Lee, K. Koetz, E. Bryl, J. Witkowski, J. Fulbright, C. M. Weyand, and J. J. Goronzy, “The Influence of Age on T Cell Generation and TCR Diversity,” *J. Immunol.*, vol. 174, no. 11, pp. 7446–7452, 2005.
- [61] J. Gui, X. Zhu, J. Dohkan, L. Cheng, P. F. Barnes, and D. M. Su, “The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells,” *Int. Immunol.*, vol. 19, no. 10, pp. 1201–1211, 2007.
- [62] J. S. Sutherland, G. L. Goldberg, M. V. Hammett, A. P. Uldrich, S. P. Berzins, T. S. Heng, B. R. Blazar, J. L. Millar, M. A. Malin, A. P. Chidgey, and R. L. Boyd, “Activation of Thymic Regeneration in Mice and Humans following Androgen Blockade,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 4, pp. 2741–2753, 2005.
- [63] D. M. Su, S. Navarre, W. J. Oh, B. G. Condie, and N. R. Manley, “A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation,” *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 11, pp. 1128–1135, 2003.
- [64] N. Bredenkamp, S. Ulyanchenko, K. E. O’Neill, N. R. Manley, H. J. Vaidya, and C. C. Blackburn, “An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 9, pp. 902–908, 2014.
- [65] A. M. Farley, L. X. Morris, E. Vroegindeweij, M. L. G. Depreter, H. Vaidya, F. H. Stenhouse, S. R. Tomlinson, R. A. Anderson, T. Cupedo, J. J. Cornelissen, and C. C. Blackburn, “Dynamics of thymus organogenesis and colonization in early human development,” *Development*, vol. 140, no. 9, pp. 2015–26, May 2013.
- [66] G. Balciunaite, M. P. Keller, E. Balciunaite, L. Piali, S. Zuklys, Y. D. Mathieu, J. Gill, R. Boyd, D. J. Sussman, and G. A. Holländer, “Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice,” *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 11,

pp. 1102–1108, 2002.

- [67] C. C. Blackburn and N. R. Manley, “Developing a new paradigm for thymus organogenesis,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 4, pp. 278–289, 2004.
- [68] T. Boehm, “Thymus development and function,” *Current Opinion in Immunology*, vol. 20, no. 2, pp. 178–184, 2008.
- [69] C. L. Ortman, K. A. Dittmar, P. L. Witte, and P. T. Le, “Molecular characterization of the mouse involuted thymus: Aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments,” *Int. Immunol.*, vol. 14, no. 7, pp. 813–822, 2002.
- [70] K. Kvell, Z. Varcza, D. Bartis, S. Hesse, S. Parnell, G. Anderson, E. J. Jenkinson, and J. E. Pongracz, “Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence,” *PLoS One*, vol. 5, no. 5, 2010.
- [71] L. Cheng, J. Guo, L. Sun, J. Fu, P. F. Barnes, D. Metzger, P. Chambon, R. G. Oshima, T. Amagai, and D. M. Su, “Postnatal tissue-specific disruption of transcription factor FoxN1 triggers acute thymic atrophy,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 8, pp. 5836–5847, 2010.
- [72] L. Sun, J. Guo, R. Brown, T. Amagai, Y. Zhao, and D. M. Su, “Declining expression of a single epithelial cell-autonomous gene accelerates age-related thymic involution,” *Aging Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 347–357, 2010.
- [73] E. C. Zook, P. A. Krishack, S. Zhang, N. J. Zeleznik-Le, A. B. Firulli, P. L. Witte, and P. T. Le, “Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells,” *Blood*, vol. 118, no. 22, pp. 5723–5731, 2011.
- [74] N. Bredenkamp, C. S. Nowell, and C. C. Blackburn, “Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor.,” *Development*, vol. 141, no. 8, pp. 1627–37, Apr. 2014.
- [75] J. Pongracz, K. Hare, B. Harman, G. Anderson, and E. J. Jenkinson, “Thymic epithelial cells provide Wnt signals to developing thymocytes,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1949–1956, 2003.
- [76] I. Louis, K. M. Heinonen, J. Chagraoui, S. Vainio, G. Sauvageau, and C. Perreault, “The Signaling Protein Wnt4 Enhances Thymopoiesis and Expands Multipotent Hematopoietic Progenitors through  $\beta$ -Catenin-Independent Signaling,” *Immunity*, vol. 29, no. 1, pp. 57–67, 2008.
- [77] F. Weerkamp, M. R. M. Baert, B. a E. Naber, E. E. L. Koster, E. F. E. de Haas, K. R. Atkuri, J. J. M. van Dongen, L. a Herzenberg, and F. J. T. Staal, “Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 9, pp. 3322–3326, 2006.
- [78] C. Craven, P. K. Reddy, S. P. Ringel, and R. B. Rutherford, “Effect of corticosteroids on the thymus in myasthenia gravis,” *Muscle Nerve*, vol. 4, no. 5, pp. 425–428, 1981.

- [79] R. Sacedón, A. Vicente, A. Varas, E. Jiménez, and A. G. Zapata, “Early differentiation of thymic dendritic cells in the absence of glucocorticoids,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 94, no. 1–2, pp. 103–108, 1999.
- [80] M. Hince, S. Sakkal, K. Vlahos, J. Dudakov, R. Boyd, and A. Chidgey, “The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution,” *Cellular Immunology*, vol. 252, no. 1–2, pp. 122–138, 2008.
- [81] D. B. Palmer, “The effect of age on thymic function,” *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 316, Jan. 2013.
- [82] A. C. Roden, M. T. Moser, S. D. Tri, M. Mercader, S. M. Kuntz, H. Dong, A. A. Hurwitz, D. J. McKean, E. Celis, B. C. Leibovich, J. P. Allison, and E. D. Kwon, “Augmentation of T Cell Levels and Responses Induced by Androgen Deprivation,” *J. Immunol.*, 2004.
- [83] N. J. Olsen and W. J. Kovacs, “Evidence that androgens modulate human thymic T cell output,” *J. Investig. Med.*, 2011.
- [84] M. L. Zhu, P. Bakhru, B. Conley, J. S. Nelson, M. Free, A. Martin, J. Starmer, E. M. Wilson, and M. A. Su, “Sex bias in CNS autoimmune disease mediated by androgen control of autoimmune regulator,” *Nat. Commun.*, 2016.
- [85] N. J. Olsen, G. Olson, S. M. Viselli, X. Gu, and W. J. Kovacs, “Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development,” *Endocrinology*, 2001.
- [86] M. R. Gubbels Bupp and T. N. Jorgensen, “Androgen-Induced Immunosuppression,” *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 794, 2018.
- [87] H. Hirahara, M. Ogawa, M. Kimura, T. Iiai, M. Tsuchida, H. Hanawa, H. Watanabe, and T. Abo, “Glucocorticoid independence of acute thymic involution induced by lymphotoxin and estrogen,” *Cell. Immunol.*, 1994.
- [88] M. C. Erlandsson, C. Ohlsson, J. A. Gustafsson, and H. Carlsten, “Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus,” *Immunology*, vol. 103, no. 1, pp. 17–25, May 2001.
- [89] A. L. Zoller and G. J. Kersh, “Estrogen Induces Thymic Atrophy by Eliminating Early Thymic Progenitors and Inhibiting Proliferation of  $\alpha$ -Selected Thymocytes,” *J. Immunol.*, 2006.
- [90] N. Dragin, J. Bismuth, G. Cizeron-Clairac, M. G. Biferi, C. Berthault, A. Serraf, R. Nottin, D. Klatzmann, A. Cumano, M. Barkats, R. Le Panse, and S. Berrih-Aknin, “Estrogen-mediated downregulation of AIRE influences sexual dimorphism in autoimmune diseases,” *J. Clin. Invest.*, 2016.
- [91] J. M. Greer, P. A. Csurhes, M. P. Pender, and P. A. McCombe, “Effect of gender on T-cell proliferative responses to myelin proteolipid protein antigens in patients with multiple sclerosis and controls,” *J. Autoimmun.*, 2004.
- [92] N. Shinomiya, S. Tsuru, M. Tsugita, Y. Katsura, T. Takemura, M. Rokutanda, and K.

- Nomoto, "Thymic depletion in pregnancy: kinetics of thymocytes and immunologic capacities of the hosts.," *J. Clin. & Lab. Immunol.*, 1991.
- [93] K. L. Medina and P. W. Kincade, "Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994.
- [94] T. A. Tibbetts, F. DeMayo, S. Rich, O. M. Conneely, and B. W. O'Malley, "Progesterone receptors in the thymus are required for thymic involution during pregnancy and for normal fertility.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 21, pp. 12021–12026, 1999.
- [95] Y.-H. H. Youm, H. Yang, R. Amin, S. R. Smith, T. Leff, and V. D. Dixit, "Thiazolidinedione treatment and constitutive-PPAR $\gamma$  activation induces ectopic adipogenesis and promotes age-related thymic involution.," *Aging Cell*, vol. 9, no. 4, pp. 478–89, Aug. 2010.
- [96] H. Sato, H. Sugai, H. Kurosaki, M. Ishikawa, A. Funaki, Y. Kimura, and K. Ueno, "The effect of sex hormones on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activity in mature adipocytes.," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 36, no. 4, pp. 564–73, 2013.
- [97] N. Latruffe and J. Vamecq, "Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism," *Biochimie*. 1997.
- [98] M. Ahmadian, J. M. Suh, N. Hah, C. Liddle, A. R. Atkins, M. Downes, and R. M. Evans, "Ppar $\gamma$  signaling and metabolism: The good, the bad and the future," *Nat. Med.*, vol. 19, no. 5, pp. 557–566, 2013.
- [99] L. la C. Poulsen, M. Siersbæk, and S. Mandrup, "PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 23, no. 6. pp. 631–639, 2012.
- [100] R. M. Evans, G. D. Barish, and Y. X. Wang, "PPARs and the complex journey to obesity," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 4. pp. 355–361, 2004.
- [101] P. Tontonoz and B. M. Spiegelman, "Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR $\gamma$ ," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, no. 1, pp. 289–312, 2008.
- [102] G. Medina-Gomez, S. L. Gray, L. Yetukuri, K. Shimomura, S. Virtue, M. Campbell, R. K. Curtis, M. Jimenez-Linan, M. Blount, G. S. H. Yeo, M. Lopez, T. Seppänen-Laakso, F. M. Ashcroft, M. Orešič, and A. Vidal-Puig, "PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism," *PLoS Genet.*, vol. 3, no. 4, pp. 0634–0647, 2007.
- [103] Y. Barak, M. C. Nelson, E. S. Ong, Y. Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K. R. Chien, A. Koder, and R. M. Evans, "PPAR $\gamma$  is required for placental, cardiac, and adipose tissue development," *Mol. Cell*, vol. 4, no. 4, pp. 585–595, 1999.
- [104] T. Imai, R. Takakuwa, S. Marchand, E. Dentz, J. M. Bornert, N. Messaddeq, O. Wendling, M. Mark, B. Desvergne, W. Wahli, P. Chambon, and D. Metzger, "Peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no.

- 13, pp. 4543–4547, 2004.
- [105] D. B. Savage, G. D. Tan, C. L. Acerini, S. A. Jebb, M. Agostini, M. Gurnell, R. L. Williams, A. M. Umpleby, E. L. Thomas, J. D. Bell, A. K. Dixon, F. Dunne, R. Boiani, S. Cinti, A. Vidal-Puig, F. Karpe, V. K. K. Chatterjee, and S. O’Rahilly, “Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ,” *Diabetes*, vol. 52, no. 4, pp. 910–917, 2003.
- [106] B. Staels and J. C. Fruchart, “Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists,” *Diabetes*, vol. 54, no. 8, pp. 2460–2470, 2005.
- [107] S.-S. Choi, J. Park, and J. H. Choi, “Revisiting PPAR $\gamma$  as a target for the treatment of metabolic disorders.,” *BMB Rep.*, vol. 47, no. 11, pp. 599–608, 2014.
- [108] O. Naveiras, V. Nardi, P. L. Wenzel, P. V. Hauschka, F. Fahey, and G. Q. Daley, “Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment,” *Nature*, vol. 460, no. 7252, pp. 259–263, 2009.
- [109] I. Szatmari, E. Rajnavolgyi, and L. Nagy, “PPAR $\gamma$ , a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function.,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1088, pp. 207–18, 2006.
- [110] a Chawla, Y. Barak, L. Nagy, D. Liao, P. Tontonoz, and R. M. Evans, “PPAR- $\gamma$  dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation.,” *Nat. Med.*, vol. 7, no. 1, pp. 48–52, 2001.
- [111] J. I. Odegaard, R. R. Ricardo-Gonzalez, M. H. Goforth, C. R. Morel, V. Subramanian, L. Mukundan, A. Red Eagle, D. Vats, F. Brombacher, A. W. Ferrante, and A. Chawla, “Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance.,” *Nature*, vol. 447, no. 7148, pp. 1116–20, 2007.
- [112] D. Cippolletta, M. Feuerer, A. Li, N. Kamei, J. Lee, S. E. Shoelson, C. Benoist, and D. Mathis, “PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue T reg cells,” *Nature*, vol. 486, no. 7404, pp. 549–553, 2012.
- [113] A. Garg, “Lipodystrophies,” *Am J Med*, vol. 108, no. 2, pp. 143–152, 2000.
- [114] A. Garg, “Lipodystrophies: Genetic and acquired body fat disorders,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 96, no. 11, pp. 3313–3325, 2011.
- [115] A. Garg, “Acquired and Inherited Lipodystrophies,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 12, pp. 1220–1234, 2004.
- [116] A. Garg, R. M. Peshock, and J. L. Fleckenstein, “Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety).,” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 84, no. 1, pp. 170–4, 1999.
- [117] a Garg, “Gender differences in the prevalence of metabolic complications in familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety).,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 5, pp. 1776–1782, 2000.

- [118] S. Shackleton, D. J. Lloyd, S. N. J. Jackson, R. Evans, M. F. Niermeijer, B. M. Singh, H. Schmidt, G. Brabant, S. Kumar, P. N. Durrington, S. Gregory, S. O’Rahilly, and R. C. Trembath, “LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy,” *Nat. Genet.*, vol. 24, no. 2, pp. 153–156, 2000.
- [119] K. Miehle, J. Porrmann, D. Mitter, M. Stumvoll, C. Glaser, M. Fasshauer, and K. Hoffmann, “Novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma mutation in a family with familial partial lipodystrophy type 3,” *Clin. Endocrinol. (Oxf)*., vol. 84, no. 1, pp. 141–148, 2016.
- [120] T. Nolis, “Exploring the pathophysiology behind the more common genetic and acquired lipodystrophies,” *Journal of Human Genetics*, vol. 59, no. 1. pp. 16–23, 2014.
- [121] M. C. Vantyghem, D. Vincent-Desplanques, F. Defrance-Faivre, J. Capeau, C. Fermon, A. S. Valat, O. Lascols, A. C. Hecart, P. Pigny, B. Delemer, C. Vigouroux, and J. L. Wemeau, “Fertility and obstetrical complications in women with LMNA-related familial partial lipodystrophy,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 93, no. 6, pp. 2223–2229, 2008.
- [122] R. L. Boguslavsky, C. L. Stewart, and H. J. Worman, “Nuclear lamin A inhibits adipocyte differentiation: Implications for Dunnigan-type familial partial lipodystrophy,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 15, no. 4, pp. 653–663, 2006.
- [123] A. K. Agarwal and A. Garg, “A Novel Heterozygous Mutation in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Gene in a Patient with Familial Partial Lipodystrophy,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 1, pp. 408–408, 2002.
- [124] R. K. Semple, V. K. K. Chatterjee, and S. O. Rahilly, “PPAR  $\gamma$  and human metabolic disease,” *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 3, pp. 581–589, 2006.
- [125] E. Lau, D. Carvalho, J. Oliveira, S. Fernandes, and P. Freitas, “Familial partial lipodystrophy type 3: A new mutation on the PPARG gene,” *Hormones*, vol. 14, no. 2. pp. 317–320, 2015.
- [126] M. Auclair, C. Vigouroux, F. Boccara, E. Capel, C. Vigerat, B. Guerci, O. Lascols, J. Capeau, and M. Caron-Debarle, “Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  mutations responsible for lipodystrophy with severe hypertension activate the cellular renin-angiotensin system,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 4, pp. 829–838, 2013.
- [127] K. Nadra, L. Quignodon, C. Sardella, E. Joye, A. Mucciolo, R. Chrast, and B. Desvergne, “PPAR $\gamma$  in placental angiogenesis,” *Endocrinology*, vol. 151, no. 10, pp. 4969–4981, Oct. 2010.
- [128] J. Shu, G. E. Dolman, J. Duan, G. Qiu, and M. Ilyas, “Statistical colour models: An automated digital image analysis method for quantification of histological biomarkers,” *Biomed. Eng. Online*, 2016.
- [129] P. U. Simioni, L. G. R. Fernandes, D. L. Gabriel, and W. M. S. C. Tamashiro, “Induction of systemic tolerance in normal but not in transgenic mice through continuous feeding of ovalbumin,” *Scand. J. Immunol.*, vol. 60, no. 3, pp. 257–266, Sep. 2004.

- [130] A. M. C. De Faria, S. M. Ficker, E. Speziali, J. Da Silva Menezes, B. Stransky, V. Silva Rodrigues, and N. M. Vaz, “Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 102, no. 1, pp. 67–80, 1998.
- [131] H. Kato, K. Fujihashi, R. Kato, T. Dohi, K. Fujihashi, Y. Hagiwara, K. Kataoka, R. Kobayashi, and J. R. McGhee, “Lack of oral tolerance in aging is due to sequential loss of Peyer’s patch cell interactions,” *Int. Immunol.*, vol. 15, no. 2, pp. 145–158, 2003.
- [132] A. Ramirez, M. Co, and A. Mathew, “CpG improves influenza vaccine efficacy in young adult but not aged mice,” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, 2016.
- [133] G. Talaber, K. Kvell, Z. Varecza, F. Boldizsar, S. M. Parnell, E. J. Jenkinson, G. Anderson, T. Berki, and J. E. Pongracz, “Wnt-4 Protects Thymic Epithelial Cells Against Dexamethasone-Induced Senescence,” *Rejuvenation Res.*, vol. 14, no. 3, pp. 241–248, 2011.
- [134] R. A. Hegele, “Familial partial lipodystrophy: A monogenic form of the insulin resistance syndrome,” *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 71, no. 4. pp. 539–544, 2000.
- [135] R. a Hegele, T. R. Joy, S. a Al-Attar, and B. K. Rutt, “Thematic review series: Adipocyte Biology. Lipodystrophies: windows on adipose biology and metabolism.,” *J. Lipid Res.*, vol. 48, no. 7, pp. 1433–44, 2007.
- [136] M. C. Vantyghem, A. S. Balavoine, C. Douillard, F. Defrance, L. Dieudonne, F. Mouton, C. Lemaire, N. Bertrand-Escoufflaire, M. F. Bourdelle-Hego, F. Devemy, A. Evrard, D. Gheerbrand, C. Girardot, S. Gumuche, C. Hober, H. Topolinski, B. Lamblin, B. Mycinski, A. Ryndak, W. Karrouz, E. Duvivier, E. Merlen, C. Cortet, J. Weill, D. Lacroix, and J. L. Wémeau, “How to diagnose a lipodystrophy syndrome,” *Annales d’Endocrinologie*, vol. 73, no. 3. pp. 170–189, 2012.
- [137] E. M. Crimmins, “Lifespan and healthspan: Past, present, and promise,” *Gerontologist*, vol. 55, no. 6, pp. 901–911, 2015.
- [138] J. Xie, J. Zhang, H. Wu, X. Tang, J. Liu, G. Cheng, and P. Li, “The influences of age on T lymphocyte subsets in C57BL/6 mice,” *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 108–113, 2017.
- [139] B. R. Becklund, J. F. Purton, C. Ramsey, S. Favre, T. K. Vogt, C. E. Martin, D. S. Spasova, G. Sarkisyan, E. LeRoy, J. T. Tan, H. Wahlus, B. Bondi-Boyd, S. A. Luther, and C. D. Surh, “The aged lymphoid tissue environment fails to support naïve T cell homeostasis,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 30842, 2016.
- [140] S. Rane, T. Hogan, B. Seddon, and A. J. Yates, “Age is not just a number: Naive T cells increase their ability to persist in the circulation over time,” *PLoS Biol.*, vol. 16, no. 4, 2018.
- [141] K. Haq and J. E. McElhaney, “Immunosenescence: influenza vaccination and the elderly,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 29, pp. 38–42, Aug. 2014.

## Publikációk jegyzéke

### Az értekezés alapját képező publikáció

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

Impakt faktor: **5,551**

Független citáció: 2

### Egyéb eredeti publikációk

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

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

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

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

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

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



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

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

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

Impakt faktor: **29,808**

Összes független citáció: 26

## **Kongresszusi prezentációk**

Krisztina Banfai; Kitti Garai; **David Ernszt**; Judit E. Pongracz; Krisztian Kvell. Role of Wnt4 exosomes in thymic ageing. ISEV 2018, Barcelona 2018.05.05.

Krisztina Banfai, Kitti Garai, **David Ernszt**, Judit E. Pongracz, Krisztian Kvell. Significance of Wnt4-exosomes in thymic senescence. 4th International Cholnoky Symposium. 10-11 May, 2018

M Payrits, É Sággy, K Csekő, K Pohóczky, K Bölcskei, **D Ernszt**, K Barabás, J Szolcsányi, I Ábrahám, Z Helyes, É Szőke. Estradiol sensitises the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channel in pain responses. 13th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides. Hong Kong, Kína 2017. dec. 3-7. *előadás*

Krisztina Banfai, Kitti Garai, **David Ernszt**, Judit E. Pongracz, Krisztian Kvell. Engineered long-term human artificial 3D thymus cultures. III Nemzetközi interdiszciplináris 3D konferencia. Pécs, Magyarország 2017.október 5-6

**Ernszt David**, Banfai Krisztina, Pap Attila, Savage David, Pongracz Judit Erzsebet, Kvell Krisztian. Impaired PPAR $\gamma$  function delays thymic senescence. III. Cholnoky László Nemzetközi Szakkollégiumi Szimpózium. 2017. május 11 – 12. *előadás*

Krisztina Bánfai, **Dávid Ernszt**, Kitti Garai, Krisztian Kvell. En route to artificial functional personalized human thymus tissue from peripheral blood. III. Cholnoky László Nemzetközi Szakkollégiumi Szimpózium. 2017. május 11 – 12. *előadás*

Szöke É., Payrits M., Sággy É., Szolcsányi J, Csekő K, Pohóczky K, Bölcskei K, **Ernszt D**, Barabás K, Ábrahám I and Helyes Z: Effect of estradiol on gating of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channels in sensory neurons and in *in vivo* animal models. RegPep2016, Rouen, Franciaország 2016.

Szöke É., Payrits M., Sággy É., Bíró-Sütő T., Pohóczky K., Csekő K., Bölcskei K., **Ernszt D.**, Barabás K., Ábrahám I., Szolcsányi J., Helyes Zs. Az ösztadiol szerepe Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 ioncsatin aktivációjában szenzoros neuronokon és *in vivo* állatkísérletekben. FAMÉ2016, Pécs, Magyarország 2016. Pécs

Diána Feller, Veronika Csöngéi, Tamás Kovács, József Kun, **Dávid Ernszt**, Zsuzsanna Helyes, Judit E Pongrácz. Wnt5a – regulator of molecular events leading to inflammation and cancer in the lung *European Respiratory Journal* 46: PA5100; DOI: 10.1183/13993003.congress-2015.PA5100. September 2015.

Edit Kiss, Monika Avdicevic, **David Ernszt**, Judit Pongracz. Comparative analysis of cisplatin treatment in *in vitro* 3D lung microtissue and monolayer cell cultures. *European Respiratory Journal* 46(59):PA4265 DOI10.1183/13993003.congress-2015.PA4265. September 2015.

Andreidesz Kitti, Kiss Edit, **Ernszt Dávid**, Monika Avdicevic Gyógyszerészi Biotechnológia Tanszék Studies of 2-(4-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone and 2-(4-methylbenzylidene)-1-benzosuberone cytotoxic properties in a lung adenocarcinoma cell line, A549 and in primary human fibroblasts. 2015 TDK konferencia. *előadás*

Krisztian Kvell, **David Ernszt**, Dorottya Kardos, Sarra Baehl, Tamas Fulop, Judit Pongracz. Combined use of exosome miRNA, TREC and thymulin values as circulating biomarkers of immune senescence. The Fifth International Meeting of ISEV International society for extracellular vesicles Annual Meeting-ISEV2016 Rotterdam, The Netherlands 4-7 May 2016.

**D. Ernszt**, Z. Keller, J.E. Pongracz, K. Kvell: The role of miR-200 in central immune senescence. Cell Conference on Regulatory RNAs. October 19-21 2014 Berkeley, California, USA

**Ernszt Dávid**, Zsófia Keller, Pongrácz E. Judit, Kvell Krisztián. Wnt4 prevents but PPAR $\gamma$  promotes beige thymic adipose involution *Magyar Immunológiai Társaság* 43. Vándorgyűlésére, 2014. október 15-17. Velence

**Ernszt Dávid**, Keller Zsófia, Kvell Krisztián. Browning of thymic stromal network: changes in UCP1 expression level during ageing **Cholnoky László Szakkollégium Nyitónap 2014. szeptember 19. Pécs**

**Ernszt Dávid**, Kun József, Pongrácz Judit Erzsébet, Helyes Zsuzsanna. TRPV1 receptor az immunrendszerben: TRPV1 funkció vizsgálata egér T-limfocitákon. Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság rendezvényére, a Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV. 2014. április 10-12.

Kovacs T, Csongei V, Feller D, **Ernszt D**, Bartis D, Pongrácz JE: Altered Wnt microenvironment during pulmonary senescence leads to drastic decline of the alveolar epithelial surface. ERS Lung Science Conference 2014 Estoril, Portugal. March 21-23, 2014

Kovács T., Csongei V, **Ernszt D.**, Bartis D, Pongrácz JE.: Wnt4 promotes lung aging via inhibition of PPAR $\gamma$  expression. 10th János Szentágothai transdisciplinaty conference and student competition. Pécs, Hungary. 4-5 November 2013. ISBN 978-963-642-567-8

Kovács T. Csongei V. **Ernszt D.** Bartis D. Pongrácz JE: Wnt4 promotes tissue destruction during lung aging via inhibition of PPAR $\gamma$  expression. 2nd international Doctoral Workshop in Natural Sciences. 2013. (First prize winner in oral presentation section) *előadás*

J Kun, Z Helyes, I Szitter, Á Kemény, **D Ernszt**, T Kovács, A Bognár, K Pohóczky, É Szőke, É Sággy, T Bagoly, A Markovics, A Perkecz, E Pintér: Transient receptor potential ankyrin 1 (trpa1) receptor knockout mice are more susceptible to dextrane-sulfate induced colitis. 3. Congress of Croatian Physiological Society, Rijeka, Croatia 13-15 September 2013. (Abstract published: Periodicum Biologorum, Vol 115, Suppl 2, P1-60, Zagreb, September, 2013, ISSN 0031- 5362.)

**Ernszt Dávid**, Balog Péter, Pongrácz E. Judit. The deletion of transcription factor Nkx2.3 influences thymic function and senescence. 43. Membrán-Transzport Konferencia. Sümeg, Magyarország 2013 május 21-24.

Kovács Tamás, **Ernszt Dávid**, Pongrácz E. Judit: Az öregedő tüdő molekuláris mintázata. 43. Membrán-Transzport Konferencia. Sümeg, Magyarország 2013 május 21-24.

Kovács T, **Ernszt D**, Pongrácz JE: The molecular pattern of aging lung (First prize winner in Medical Poster section). 9th János Szentágothai Interdisciplinary Conference and Student Competition, Pécs, Hungary, 3-4 May 2013. ISBN 978-963-642-519-7

Feller D., Helyes Zs., Rapp J., Kun J., **Ernszt D.**, Kovács T., Pongracz E. J.: Changes in expression levels of Wnt signalling molecules in cigarette smoke- induced experimental

model systems. 9<sup>th</sup> János Szentágothai Inredisciplinary Conference and Student Competition, Pécs, Hungary, 3-4 May 2013. ISBN: 978-963-642-519-7

**Ernszt Dávid**; Péter Balogh; Judit E. Pongrácz. The deletion of transcription factor Nkx2.3 influences thymic function and senescence. János Szentágothai Memorial Conference and Student Competition. Pécs, Hungary 29-30 Oct, 2012. Abstract book p.: 31 ISBN: 978-963-642-495-4

## **Könyvfejezet**

**David Ernszt**, Krisztina Banfai, Zoltan Kellermayer, Attila Pap, Janet M Lord, Judit E Pongracz, Krisztian Kvell: Loss of PPAR $\gamma$  Function Prevents Thymic Aging. In: Top 10 Contributions on Immunology (Chapter 8). Avidscience (2018.04.16. ISBN: 978-93-86337-88-7)

## Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

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



# 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 effects). 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

## INTRODUCTION

The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) molecular family is widely studied (1–3). These nuclear receptor proteins possess transcription factor activities and influence multiple cellular events at the molecular level including adipocyte differentiation and metabolism. Among them, PPARgamma is of particular interest being expressed by all adipose tissue subtypes and being indispensable for adipose tissue development and for the homeostasis of physiological metabolism (4–7). As a consequence, in the mouse systemic loss of PPARgamma activity severely impairs glucose and lipid metabolism as characterized by others (8–10). In accordance, PPARgamma null mice are only viable if using conditional knockout strategy (11). Similar to the mouse above, in human PPARgamma haplo-insufficiency leads to the development of a rare metabolic condition known as familial partial lipodystrophy, type 3 (FPLD3, ORPHA 79083) also characterized by diabetes and dyslipidemia (12–15).

In mammals, systemic PPARgamma activity may be increased at multiple levels. Environmental factors including excessive caloric consumption or corticosteroid exposure increase PPARgamma activity systemically (16–18). Pharmacological systemic activation may be achieved through administration of thiazolidinediones previously used as part of oral antidiabetic treatment, but currently neglected due to adverse cardiovascular side effects (19, 20). Genetic engineering-based enhancement of PPARgamma activity in mouse models has also been performed (21). In every case, increased PPARgamma activity promotes adipose tissue development at multiple sites of the body.

Thymic aging is observed as adipose involution during which the functional thymus niche that normally supports T-cell production is gradually lost and replaced by adipose tissue (22). The process starts focally in childhood then spreads and accelerates with puberty due to hormonal changes (23). Diminishing T-cell production results in decreased availability of fresh naive T-cells (24). Consequences include increasing incidence of infection, cancer and autoimmunity observed at senior ages (25, 26). Thymic adipose involution appears to be PPARgamma-dependent: any condition that systemically enhances PPARgamma activity—either environmental, pharmacological, or genetic—accelerates thymic senescence or adipose involution with all its immunological consequences (27–32). However, the opposite phenomenon whether systemically decreased PPARgamma activity can ameliorate long-term functional immune parameters has barely been addressed (33, 34). For this reason, we have set out to characterize the effect of systemic genetic PPARgamma loss of function on long-term immune homeostasis in both mouse and human.

## MATERIALS AND METHODS

### Human Thymus Samples

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) human thymus samples from age groups 30–40, 50–60, and 70–80 years were obtained from the Department of Pathology (Faculty of Medicine, University of Pecs, Hungary.) Experiments involving human thymus samples were performed with the consent of the Regional and Local Ethics Committee of Clinical Centre, University of

Pecs (ref. no.: 6331/2016) according to their guidelines. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

### Human Immunohistochemistry

Human thymus lobes were fixed in paraformaldehyde (4% PFA in PBS) then paraffin embedded. 5  $\mu$ m thick sections were stained using immunohistochemistry (35). First, the slides were rinsed in heated xylene and were washed with a descending series of alcohol to remove paraffin. After deparaffination the slides were rehydrated in distilled water and antigen retrieval was performed by heating the slides in Target Retrieval Solution (pH 6 DAKO) at 97°C for 20–30 min. Subsequently slides were washed in dH<sub>2</sub>O and endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> containing TBS (pH 7.4) for 15 min. Then slides were washed three times with TBS containing Tween (0.05%, pH 7.4). Pre-blocking was carried out with 3% BSA in TBS for 20 min before overnight incubation with anti-PPARgamma (1:100, rabbit monoclonal antibody clone: C26H12 Cell Signalling Technology) primary antibody at 4°C. Following incubation slides were washed with TBS for three times then incubated with peroxidase conjugated secondary antibody (1:100, Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG, DAKO) for 90 min. Antibody labeling was visualized with the help of liquid DAB Substrate Chromogen System (DAKO). For nuclear counterstaining, hematoxylin staining was performed. Finally, slides were mounted with Faramount Aqueous Mounting Medium (DAKO). Histological evaluation was performed with the help of Panoramic MIDI digital slide scanner (3DHitech). Image analysis was performed using ImageJ software with IHC toolbox plug-in.

### Mouse Breeding and Maintenance

For certain experiments, we have used wild-type and PPARgamma heterozygous (haplo-insufficient) or PPARgamma null (KO) mice of C57BL/6J genetic background. The mice were age matched, and both genders were used for the investigation. The design to generate PPARgamma KO mice was described previously (11). Briefly, PPARgamma<sup>+/-</sup>/Sox2Cre<sup>+</sup> male mice were crossed with PPARgamma fl/fl female mice to generate heterozygous PPARgamma<sup>fl/-</sup>/Sox2Cre<sup>-</sup> and homozygous PPAR gamma $\Delta^{fl/-}$ /Sox2Cre<sup>+</sup> mice, wherein the floxed allele was recombined resulting a null allele. Mice were housed under minimal disease conditions in the Laboratory Animal Core Facility of University of Debrecen. Animal rooms were ventilated 15 times/h with filtered air, mice received autoclaved pellet diet (Altromin VRF1) and tap water *ad libitum*. The cages contained sterilized bedding. Room lightning was automated with 12 h light and 12 h dark periods. The room temperature was 21  $\pm$  2°C, the relative humidity is between 30 and 60%. Senescent animals developed and aged normally, without any treatment. Permission to perform the described animal experiments was granted to the relevant utilities of the University of Pecs (ref. no.: BA02/2000-46/2016). Permission to generate PPARgamma GM mice was granted to the relevant utilities of the University of Debrecen (ref. no.: TMF/82-10/2015). Permission to perform experimental procedures with PPARgamma GM mice was granted to the relevant utilities of the University of Pecs (ref. no.: TMF/124-11/2017).

## Mouse Immunofluorescence

Immunofluorescent staining was performed on 8  $\mu\text{m}$  cryosections of mouse thymus lobes as described previously (35). Briefly, the slides were fixed in cold acetone, then dried and blocked to prevent non-specific staining using 5% BSA in PBS for 20 min before staining with fluorochrome-conjugated or primary antibodies: anti-EpCAM1-FITC (1:100, rat monoclonal antibody clone: G8.8), anti-Ly51-PE (1:100, rat monoclonal antibody clone: 6C3, eBioscience), and anti-PPARgamma (rabbit monoclonal antibody clone: C26H12 Cell Signaling Technology). For secondary antibody, Alexa-555 conjugated a-rabbit goat IgG (1:200, Life Technologies) was used. In certain cases, DAPI (Life Technologies) nuclear counterstain was also applied. Sections were analyzed using a Nikon Eclipse Ti-U microscope equipped with a CCD camera (Andor Zyla 5.5) and NIS-Elements software. The medulla/cortex ratio was calculated using ImageJ software.

## Mouse Flow Cytometry

Thymocyte subsets and T-cell subpopulations in blood were investigated by flow-cytometry as published by others (36, 37). Thymocytes and PBMC were isolated from mice and labeled with fluorophore-conjugated antibodies in PBS-BSA (5% BSA diluted in PBS). In every case, 100,000 cells were stained for measurement. Incubation with antibodies was performed at 4°C for 60 min followed by a washing step. FACSCanto II flow-cytometer and FACSDiva software (Becton Dickinson) were used for analysis. In every case, 10,000 events (parent R1 morphological lymphocyte gate) were recorded by flow-cytometry. For thymocyte subset measurement, Alexa-647 conjugated anti-mouse CD4 (clone: YTS 191) and FITC-conjugated anti-mouse CD8 (clone: IBL 3/25) antibodies were used (both produced in the Department of Immunology and Biotechnology, University of Pecs, Hungary). For peripheral blood T-cell subpopulation analysis, Pacific Blue-conjugated anti-mouse CD3 (clone: 17A2), PerCP-conjugated anti-mouse CD4 (clone: GK1.5), APC/Cy7-conjugated anti-mouse CD8 (clone: YTS156.7.7), PE-conjugated anti-mouse CD44 (clone: IM7), APC-conjugated anti-mouse CD62L (clone: MEL-14) (all purchased from BioLegend), and FITC-conjugated anti-mouse CD19 (clone: 1D3, produced by the Department of Immunology and Biotechnology, University of Pecs, Hungary) were used.

## T-Cell Recombination Excision Circle (TREC) Measurement by Digital qPCR in Mouse and Human

T-cell recombination excision circle by-products of gene-rearrangement in fresh naive T-cells were also assessed. We performed mouse Trec (mTrec) digital qPCR using mouse and human Trec (hTrec) digital qPCR using human samples by adapting methods published by others (38). Briefly, DNA was isolated from mouse thymocytes using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instruction. For human, peripheral-blood samples were processed using the DNA Blood Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's guides. Absolute copy numbers were measured by digital PCR

on the QuantStudio 3D Digital PCR platform (ThermoFisher) using 30 ng DNA per sample. Taqman primers/probes and digital qPCR reagents were also purchased from ThermoFisher and used as suggested. For age-matched range of healthy human hTrec values, refer to the work of Lynch et al. (38). Permission to perform the described animal experiments was granted to the relevant utilities of the University of Pecs (ref. no.: BA02/2000-46/2016). Experiments involving human blood samples were performed with the consent of the Regional and Local Ethics Committee of Clinical Centre, University of Pecs (ref. no.: 6439/2016) according to their guidelines.

## Oral Tolerance Induction in Mouse

Induction and evaluation of oral tolerance was performed as described by others (39–41). Briefly, both wild-type and PPARgamma haplo-insufficient mice received 5 mg/ml ovalbumin (OVA, Sigma-Aldrich) in drinking water for seven days. On day 7, mice were challenged with an intraperitoneal injection of 5  $\mu\text{g}$  ovalbumin in 200  $\mu\text{l}$  of 1:1 of PBS:complete Freund adjuvant. On day 14, mice received an intraperitoneal injection of 5  $\mu\text{g}$  ovalbumin in 200  $\mu\text{l}$  of 1:1 of PBS:incomplete Freund adjuvant. Serum was collected on day 21 and anti-OVA IgG antibodies were measured by ELISA. Briefly, 96-well Microtest Plates (Sarstedt) were coated with OVA and blocked with BSA. Then plates were incubated with serial dilutions of mouse serum samples (1:100–1:3,200). The antibody content was visualized with the help of HRP-conjugated antimouse immunoglobulin antibody (rabbit polyclonal, Dako). Optical density was measured at 492 nm with iEMS Reader MF equipment (Thermo Labsystems).

## Influenza Vaccination in Mouse

The efficiency of influenza vaccination was investigated as described elsewhere (42). Briefly, both wild-type and PPARgamma haplo-insufficient mice were injected intramuscular once with 0.1 ml human seasonal influenza vaccine cocktail (3Fluart) to mimic human vaccination at 9 months of age. In order to imitate human exposure pattern serum antibody IgG titer against H1N1 A/California/7/2009 strain (part of 3Fluart) was measured by ELISA three months after initial single vaccination at 12 months of age. For detection, ELISA plates were coated with 0.05  $\mu\text{g}$  HA protein of influenza strain A (Recombinant subtype H1N1 A/California/7/2009 His Tag, Life Technologies). Then plates were incubated with serial dilutions of mouse serum samples (1:5–1:1,600). The antibody content was visualized with the help of HRP conjugated a-mouse immunoglobulin antibody (rabbit polyclonal, Dako). Optical density was measured at 492 nm with iEMS Reader MF equipment (Thermo Labsystems).

## Statistical Analysis

All experiments were performed at least on three occasions, representative experiments are shown. Measures were obtained in triplicates, data are presented as mean and +SD as error bars. Graphpad Prism software was used for statistical analysis. Two-tailed Student's *t*-test was applied. Significant differences are shown by asterisks (ns for not significant, \* for  $p \leq 0.05$ , \*\* for  $p \leq 0.01$ , \*\*\* for  $p \leq 0.001$ ).



## RESULTS

### PPARgamma Distorts the Ratio of Thymic Epithelial Compartments with Age

Previously reported mouse results showed increasing PPARgamma expression with age in the thymic epithelial compartments, accompanied by thymic adipose involution. We have set out to prove human relevance of previous mouse findings and test whether PPARgamma activity influences the ratio of thymic epithelial compartments.

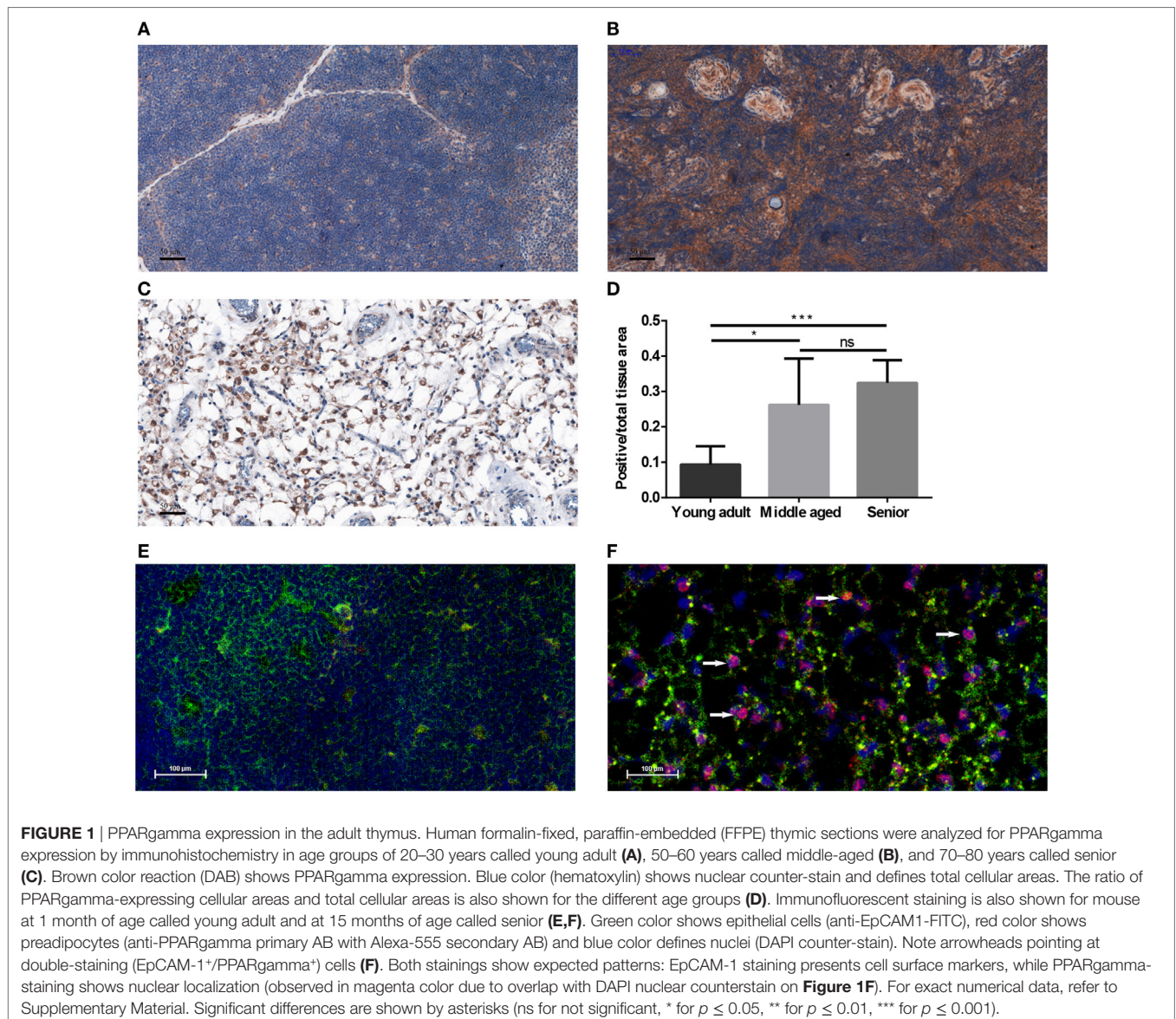
### PPARgamma Expression Increases in the Adult Thymus with Age

Human FFPE thymic sections were analyzed for their PPARgamma expression in several adult age groups from young through middle-aged to senior (Figures 1A–D). Our results

indicate that PPARgamma expression significantly and progressively increases with age (Figures 1A–C). Of note, total cellular areas shrink at senior ages in both human (Figure 1C) and mouse (Figure 1F). As a result the ratio of PPARgamma-expressing cellular areas shows relative increase with age (Figure 1D). Immunofluorescent staining of mouse thymic cryosections at 15 months of age (Figure 1F) provides visual support for thymic epithelial to adipose transdifferentiation in harmony with the working hypothesis of cellular transdifferentiation. A portion of stromal cells shows dual staining for epithelial identity and adipose differentiation, a hallmark of thymic adipose involution. This phenomenon is not observed at young adult age (Figure 1E).

### PPARgamma Skews the Ratio of Epithelial Compartments with Age

Mouse thymic cryosections were differentially stained for medullary and cortical epithelial compartments at several ages



and using various genetic backgrounds (Figures 2A–D). Our results show that in the wild-type setting the medullary epithelial compartment significantly shrinks with age as reported previously (31). This, however, is not observed in PPARgamma deficient settings. Loss of PPARgamma activity shows protection in a progressive manner presenting dose–response (Figure 2E). PPARgamma deficiency efficiently and significantly prevents the erosion of the medullary epithelial compartment, otherwise prone to shrink with senescence.

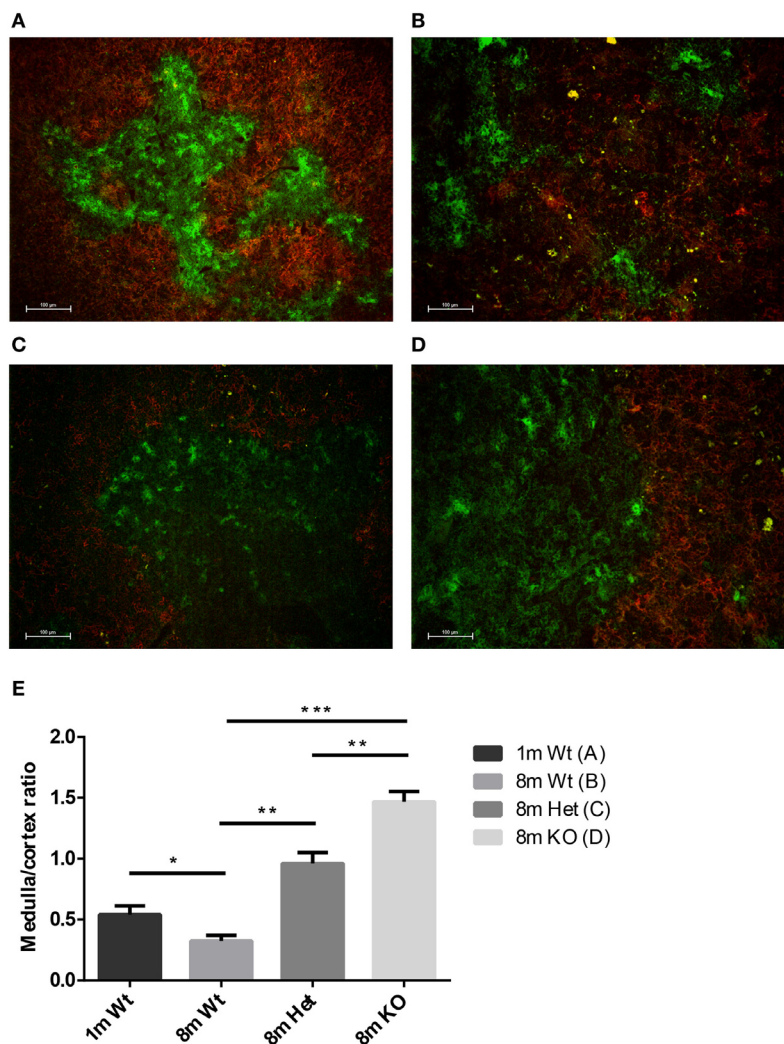
## PPARgamma Affects Thymic T-Cell Production and Peripheral Blood T-Cell Distribution with Age

We have observed changes in thymus architecture in response to PPARgamma status. Consequently, we were interested in

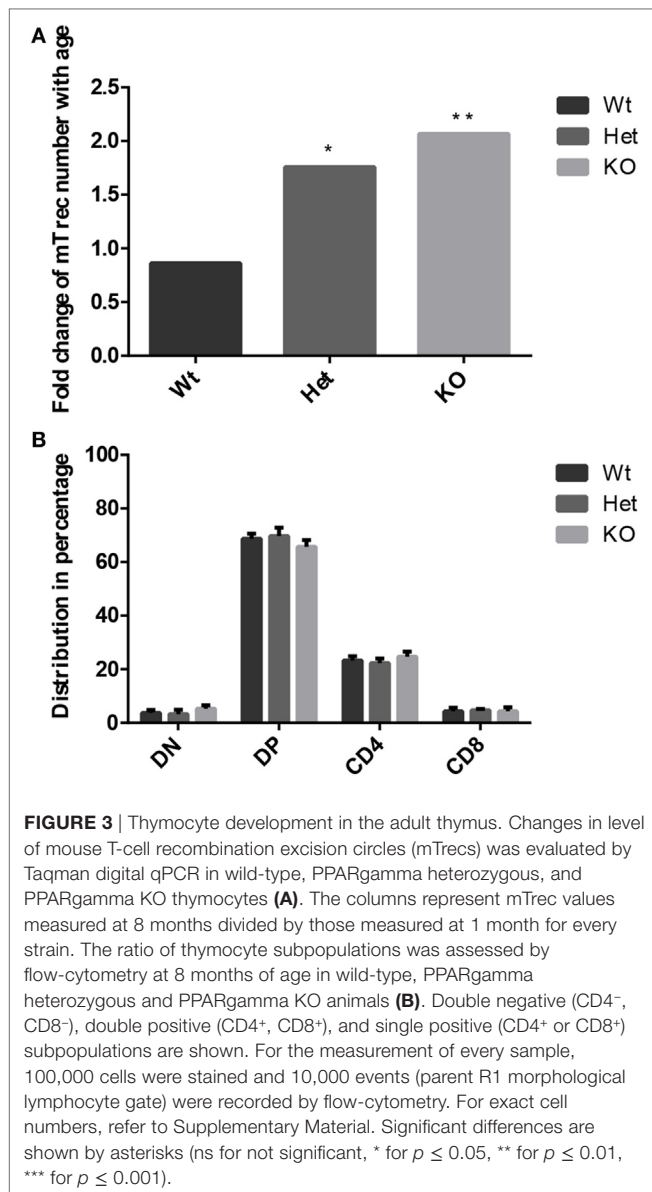
whether morphological changes alter thymus function: naive T-cell production. Going beyond, we were eager to see if sustained influence of PPARgamma status on thymocyte function is also reflected in the peripheral blood.

## PPARgamma Disturbs Thymic T-Cell Output with Age

Age-related changes in thymocyte levels of mTrec (DNA loop by-product of mouse T-cell receptor gene rearrangement) were evaluated in wild-type and PPARgamma deficient settings using digital qPCR (Figure 3A). Our results indicate slight (though not significant) decrease of mTrec and hence fresh-naive T-cell output with age in thymocytes of wild-type mice. PPARgamma deficiency significantly and progressively counteracts the process also showing dose-responsive increase of thymocyte mTrec levels. In further analyses, the percent distribution of thymocyte



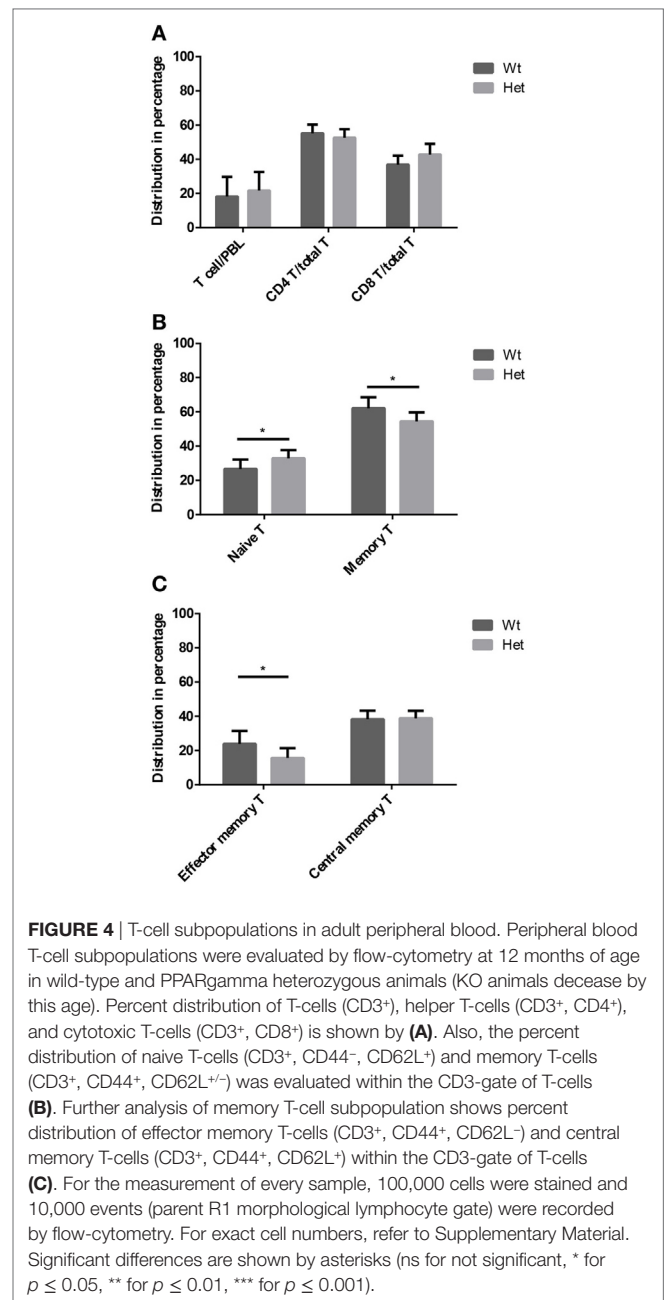
**FIGURE 2 |** Ratio of epithelial compartments in the adult thymus. Mouse thymic cryosections were stained differentially for medullary (anti-EpCAM1-FITC<sup>+</sup>, anti-Ly51-PE<sup>-</sup>) and cortical (anti-Ly51-PE<sup>+</sup>, anti-EpCAM1-FITC<sup>+</sup>) epithelial compartments. Wild-type thymus is shown at 1 month (A) and 8 months of age (B). PPARgamma heterozygous (C) and PPARgamma KO (D) animals are shown at 8 months of age. The ratio of medullary and cortical epithelial compartment is also shown (E) for both ages and genetic backgrounds. For exact numerical data, refer to Supplementary Material. Significant differences are shown by asterisks (ns for not significant, \* for  $p \leq 0.05$ , \*\* for  $p \leq 0.01$ , \*\*\* for  $p \leq 0.001$ ).



subpopulations was assessed using flow-cytometry in wild-type and PPARgamma deficient mice (Figure 3B). All thymocyte subpopulations showed near identical distribution pattern with all genetic backgrounds. Taken together, PPARgamma deficiency progressively enhances thymocyte development in adult age, but without skewing the distribution of thymocyte subpopulations or their differentiation preference.

### PPARgamma Influences T-Cell Subpopulation Distribution in Adult Peripheral Blood

Peripheral blood T-cell subpopulations were evaluated by flow-cytometry at 12 months of age in wild-type and PPARgamma deficient animals. Our results do not show differences in the percent distribution of the major T-cell groups of helper T-cells and cytotoxic T-cells (Figure 4A) within the CD3-gate of T-cells. However, the evaluation of naive T-cell and memory T-cell ratio



reveals significant effect of PPARgamma deficiency (Figure 4B). There is significant increase of naive T-cells in the peripheral blood of PPARgamma deficient animals compared to wild-type animals, conversely and significantly decreasing the memory T-cell pool within the CD3-gate of T-cells. Deeper analysis of the memory T-cell pool reveals it is the mobile effector memory T-cell subpopulation that shows significant decrease and not central memory T-cells (Figure 4C) within the CD3-gate of T-cells. Sustained and prolonged naive T-cell production due to PPARgamma deficiency in the thymus as suggested by mTrec values above apparently affects peripheral blood T-cell subpopulations as shown here.

## Functional Immunological Consequence and Human Relevance

Having seen the far-reaching influence of PPARgamma status on thymus architecture, thymus function and peripheral blood T-cell composition with age, we have set out to test whether these changes have functional immunological relevance. If so, it would be also of high interest to test if our comprehensive mouse results have human relevance.

### PPARgamma Modulates Immune Regulation and Immune Response

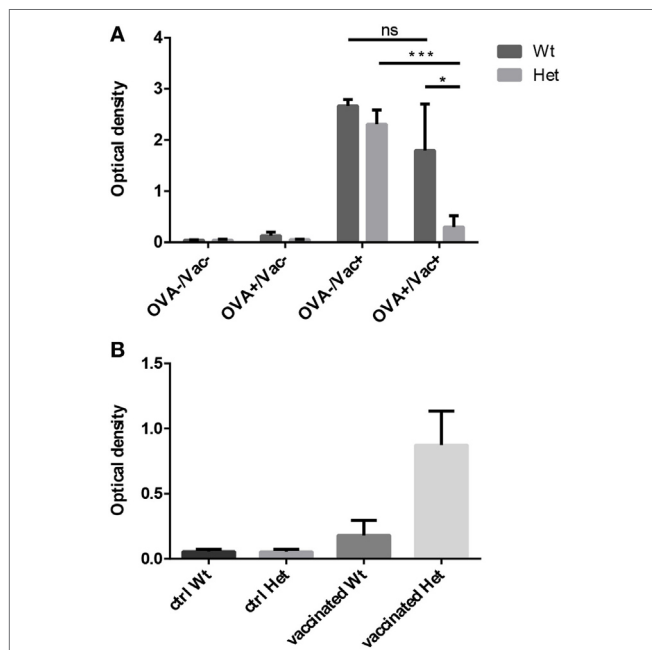
We have tested the capacity to mount oral tolerance to the foreign protein OVA in wild-type and PPARgamma deficient aged adult mice by measuring OVA-specific IgG titers following oral and/or intraperitoneal OVA challenge (Figure 5A). As reported by others, age impairs oral tolerance in wild-type animals (40, 41). As a consequence, there is only moderate, insufficient decrease of OVA-specific IgG titers in case of parallel oral OVA administration and i.p. OVA-injection in senior animals. However, PPARgamma deficiency rescues oral tolerance in the same

experimental setting despite age, profoundly and significantly decreasing OVA-specific IgG titers (Figure 5A). Consequently, naive T-cell dependent immune regulation (oral tolerance) remains efficient in PPARgamma heterozygous animals despite their age.

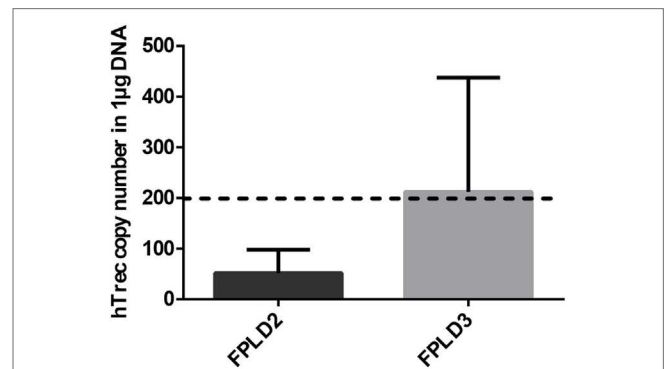
The capacity to mount immune reaction to foreign influenza antigens was also tested as human seasonal influenza vaccine was injected into aged adult wild-type and PPARgamma deficient animals. Subsequent analysis of serum IgG titers specific to a vaccine component showed elevated protective antibody production (maximal ELISA OD values) in PPARgamma deficient animals, but not in their wild-type littermates (Figure 5B). This tendency is not significant because of individual variation observed due to the applied human vaccination protocol being inferior to standard mouse immunization protocol. Nevertheless, naive T-cell dependent immune response proves to be efficient in aged, PPARgamma heterozygous animals.

### Human Evidence of PPARgamma Deficiency Preventing Thymic Senescence

Genetic PPARgamma deficiency is a rare, but existing condition in human called FPLD3 (15). It leads to a metabolic phenotype called lipodystrophy, similar to the mouse (11–15). Other rare human conditions not affecting PPARgamma can also lead to lipodystrophy (12–15). In case of FPLD2 lamin mutations trigger similar metabolic changes (14). Peripheral blood hTrec (DNA loop by-product of human T-cell receptor gene rearrangement) levels were measured using digital qPCR in age-matched patients with FPLD2 condition and FPLD3 condition (Figure 6). As expected and in perfect harmony with previous mouse thymocyte results elevated mean hTrec levels were detected in FPLD3 samples compared to FPLD2 samples. The tendency is



**FIGURE 5** | Functional immunological experiments in adult hosts. Oral tolerance induction capacity to ovalbumin (OVA) was assayed in wild-type and PPARgamma heterozygous animals at 12 months of age. Animals received OVA by either drinking water, i.p. injection, both or neither. OVA-specific IgG titers were evaluated 3 weeks later by ELISA method (A). The presented figure was obtained using 1:400 dilution of serum. Mean ELISA OD values are shown for each study group. Human seasonal influenza vaccine (3Fluort) was injected (0.1 ml, 1x, i.m.) into wild-type and PPARgamma heterozygous animals at 9 months of age. Serum IgG titers specific to a vaccine component (H1N1 A/California/7/2009 strain) were tested 3 months later by ELISA method (B). The presented figure was obtained using 1:50 dilution of serum. Maximal ELISA OD values are shown for each study group. For exact numerical data, refer to Supplementary Material. Significant differences are shown by asterisks (ns for not significant, \* for  $p \leq 0.05$ , \*\* for  $p \leq 0.01$ , \*\*\* for  $p \leq 0.001$ ).



**FIGURE 6** | Thymus function in adult FPLD patients. Level of human T-cell recombination excision circle (hTrec) was measured by Taqman digital qPCR in peripheral blood leukocytes of age-matched and disease-matched rare disease patients with FPLD2 condition (lipodystrophy due to LMNA deficiency) and FPLD3 condition (lipodystrophy due to PPARgamma deficiency) (Figure 6). Patient sample numbers were  $n = 3$  for FPLD2 and  $n = 5$  for FPLD3. For exact numerical data, refer to Supplementary Material. For age-matched (approx. 50 years of age) range of healthy human hTrec values, refer to the work of Lynch et al. (38). Accordingly, the lower limit of healthy human hTrec threshold (approximately 200 copies/µg DNA) is represented by dotted line.

not significant due to individual variation within the patient groups. Unfortunately, current patient sample numbers cannot be increased due to the extremely rare nature of these conditions (FPLD2 or ORPHA 2348 has prevalence of  $\leq 1/1,000,000$  and FPLD3 or ORPHA 79083 also has prevalence of  $\leq 1/1,000,000$ ) (14, 15). For age-matched range of healthy human hTrec values, refer to the work of Lynch et al. (38). Lower limit of healthy human hTrec threshold (approx. 200 copies/ $\mu\text{g}$  DNA) is not reached by FPLD2 (lamin) patient samples, but this is rescued in FPLD3 (PPARgamma) patients despite being age and disease matched.

## DISCUSSION

### PPARgamma Drives Thymic Epithelial to Adipose Trans-Differentiation with Age

It has been previously suggested based on direct fate-mapping experiments that with senescence thymic adipose tissue develops from the thymic stromal or epithelial compartment (28). Based on indirect evidence others have also supported this concept (29). In further support, we here present visual evidence of epithelial to adipose transdifferentiation in the mouse. This is indicated by the presence by EpCAM-1/PPARgamma double-positive cells shown by histology (Figure 1D). These cells still express cell surface markers of their fading thymic epithelial identity (EpCAM-1), but already show early signs of the novel adipocyte differentiation program in their nuclei (PPARgamma). The fact that such double positive cells show rather scattered and not uniform staining pattern at a given time point may provide explanation for gradual thymic adipose involution observed during senescence.

### PPARgamma Impairs Naive T-Cell Production with Age

Thymus histology data show that the medullary compartment is rescued from age-related shrinking in case of PPARgamma deficiency (Figures 2A–D). Extended survival of this stromal niche ensures permissive environment for sustained thymus function: naive T-cell production. This is indicated by elevated mTrec values showing direct correlation with PPARgamma deficiency (Figure 3A). Of extreme importance and highlighting human relevance, peripheral blood leukocyte hTrec values from adult FPLD3 patients (with genetic PPARgamma deficiency) also exceed adult FPLD2 patient values (with unrelated genetic background) despite being age-matched and disease-matched (lipodystrophy, diabetes) (Figure 6). Of note, such metabolic disorders are known to impair thymus function indicated by decreased hTrec values as reported by others (43, 44). For exactly, this reason have we used disease-matched controls (FPLD2 vs. FPLD3) to show enhanced thymus function with PPARgamma deficiency despite metabolic disorders. Unlike lower than physiological hTrec values measured in FPLD2 (lamin) patients, those measured in FPLD3 (PPARgamma) patients are within healthy human physiological range (Figure 6). Since both mTrec and hTrec DNA loops originate from gene rearrangement during thymocyte development this

is direct evidence of sustained T-cell development indicating intact thymic niche in PPARgamma deficient animal models and human patients (38). Of note, the distribution of thymocyte subpopulations shows identical pattern irrespective of PPARgamma status proving that sustained, enhanced thymocyte development does not skew differentiation preference, but rather enhances fresh, naive T-cell production of all thymocyte subtypes uniformly (Figure 3B). Finally, since sustained thymic naive T-cell production is not restricted to a given time-point, but rather represents a continuous trend, the peripheral blood naive T-cell population shows cumulative differences as it is rescued from age-driven shrinking, against the memory T-cell population—more specifically against the effector memory T-cell pool (Figures 4B,C).

### PPARgamma Hampers T-Dependent Immune Regulation and Immunity with Age

Oral consumption of foreign T-dependent antigen normally initiates immune tolerance inhibiting any eliminative immune response (e.g., serum IgG), despite parallel immunization in young adult individuals with appropriate naive T-cell supply. Unfortunately, the phenomenon is disrupted at senior age due to the lacking naive T-cell pool in the Peyer's patches of the gut (40, 41, 45) This loss of oral tolerance (impaired immune regulation) is a possible link to increasing food intolerance prevalence observed in the aging adult population (46–49). However, the phenomenon may be rescued by PPARgamma deficiency despite age providing evidence that sustained T-cell production is necessary for efficient oral (immune) tolerance (Figure 5A).

Senescence-triggered decrease of naive T-cell output also impairs T-dependent immunity. An example in the senior human population is decreased protection from seasonal flu strains despite annual vaccination campaigns (50–52). The phenomenon has well established animal models (53–55). This is caused by low levels of neutralizing antibody titers due to lacking naive T-cells necessary during T-B cooperation to mount adequate innate immune response against T-dependent antigens of the vaccine. This, however, is not the case with PPARgamma deficiency (Figure 5B). Single intramuscular vaccination against seasonal flu (mimicking human vaccination campaign) resulted in higher maximal antibody production three months later (a typical delay in human exposure). This confirms that the cause of decreased vaccination efficiency in the senior population is impaired T-dependent immunity due to thymic senescence.

In our experiments, we have focused on the decline of T-dependent immunity since the thymus shows early and dramatic signs of senescence during adipose involution. This, however, is not the case for the B-cell compartment for which aging has been reported to occur later and in a more gradual fashion, lacking such profound histological changes (56).

PPARgamma is an enigmatic transcription factor showing unique expression pattern in both time and space throughout the body (57). PPARgamma affects both hemopoietic and stromal

compartments during development and aging. Further dissection would require to perform, e.g., bone-marrow transplantation experiments between control and PPARgamma deficient animals. However, PPARgamma KO animals develop severe metabolic disorders that hamper such experiments, especially at elevated ages.

## Limitations and Perspectives

We here present the long-term thymus- and T-dependent immunity-preserving effect of systemic (genetic) loss of PPARgamma function as observed in PPARgamma deficient mouse models and in a human rare disease (FPLD3). In both cases, there are severe metabolic drawbacks (diabetes, dyslipidemia etc.) due to systemically lacking PPARgamma activity. However, alternative, thymus tissue-restricted suppression of PPARgamma activity would likely solve the issue. Of note, as reported previously, overexpression of Wnt4 glycolipoproteins by thymic epithelial cells can efficiently counteract PPARgamma (31). Also, Wnt4 was described to travel in extracellular vesicles including exosomes and affect thymocyte differentiation (58, 59). Hence, it is conceivable that thymic epithelium-derived, enriched exosomes would efficiently home to the thymus and deliver their Wnt4 cargo locally even when administered systemically. This would, in theory, allow for the natural, tissue-specific, protein-mediated maintenance of thymic epithelial identity and prevent thymic senescence from developing.

Although tissue senescence is ultimately inevitable, there are conditions that accelerate thymic senescence including certain viral infections, intoxications, irradiation, chemotherapy, etc. Outcomes include increased incidence of infection, cancer and autoimmune disorder. In any case, the identification of molecular level targets for potential intervention is highly desired. Therefore, molecular level insight into immune senescence has medical, economical, and personal relevance, all at once.

## ETHICS STATEMENT

Experiments involving human thymus samples were performed with the consent of the Regional and Local Ethics Committee of Clinical Centre, University or Pecs (ref. no.: 6331/2016) according to their guidelines. Experiments involving human blood samples were performed with the consent of the Regional and Local Ethics Committee of Clinical Centre, University or Pecs (ref. no.: 6439/2016) according to their guidelines. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. Permission to perform the described animal experiments was granted to the relevant utilities of the University of Pecs (ref. no.: BA02/2000-46/2016). Permission to generate PPARgamma GM mice was granted to the relevant utilities of the University of Debrecen (ref. no.: TMF/82-10/2015). Permission to perform experimental procedures with PPARgamma GM mice was granted to the relevant utilities of the University of Pecs (ref. no.: TMF/124-11/2017).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

DE performed most histological, molecular biology, and statistics work in the project and was involved in manuscript preparation. KB performed all human IHC work. ZK performed oral immune tolerance experiments. AP was in charge for the breeding, metabolic, and genetic characterization of PPARgamma haploinsufficient and null mice. JL was in charge for planning human experiments, involved in manuscript preparation as well as local supervision of respective department. PE was involved in planning mouse experiments, involved in manuscript preparation as well as local supervision of respective department. KK was involved in histological, molecular biology and statistics work, also in planning experiments and manuscript preparation, and supervised the project.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the PPARgamma<sup>+/-</sup> and PPARgamma<sup>fl/fl</sup> mice that were obtained from Yaacov Barak PhD (Salk Institute, La Jolla, CA, USA) and also the Sox2Cre mice obtained from Beatrice Desvergne MD, PhD (University of Lausanne, Switzerland). We are grateful for Gregory D. Sempowski MD PhD (Duke Human Vaccine Institute, Duke University, Durham, NC, USA) for providing the Trec primer and probe sequences along with protocols for TaqMan qPCR, and also Peter Balogh MD PhD (Department of Immunology and Biotechnology, University of Pecs, Hungary) for providing test antibodies for mouse CD3, CD4, CD8. The authors wish to thank David B. Savage, MD, PhD (Metabolic Research Laboratories, School of Clinical Medicine, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom) for providing peripheral blood DNA samples from genetically verified FPLD2 and FPLD3 rare disease patients.

## FUNDING

Scientific research support was provided by the Hungarian National Science Foundation (no. 78310) and PTE AOK KA-2016-16 to KK. The project was also supported by the University of Pecs in the frame of Pharmaceutical Talent Center program and the Viral Pathogenesis Talent Center program *via* KK. The Janos Bolyai Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences also supported KK. JEP was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of GINOP 2.3.2-15-2016-00022 TAMOP-4.2.2. A-11/1/KON-2012-0024, TAMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 "National Excellence Program," PTE AOK-KA-2013/22 and EFOP-3.6.1-16-2016-00004. The present scientific contribution is also dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pecs, Hungary.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01515/full#supplementary-material>.

## REFERENCES

- Ammazzalorso A, De Filippis B, Giampietro L, Amoroso R. Blocking the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): an overview. *Chem-MedChem* (2013) 8(10):1609–16. doi:10.1002/cmdc.201300250
- Montagner A, Rando G, Degueurce G, Leuenerberger N, Michalik L, Wahli W. New insights into the role of PPARs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (2011) 85(5):235–43. doi:10.1016/j.plefa.2011.04.016
- Christodoulides C, Vidal-Puig A. PPARs and adipocyte function. *Mol Cell Endocrinol* (2010) 318(1–2):61–8. doi:10.1016/j.mce.2009.09.014
- Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene – a review. *Diabetes Metab Syndr* (2015) 9(1):46–50. doi:10.1016/j.dsx.2014.09.015
- Lefterova MI, Haakonsson AK, Lazar MA, Mandrup S. PPAR $\gamma$  and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends Endocrinol Metab* (2014) 25(6):293–302. doi:10.1016/j.tem.2014.04.001
- Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism – novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett* (2010) 584(15):3242–9. doi:10.1016/j.febslet.2010.06.010
- Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* (2008) 77:289–312. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829
- Duan SZ, Ivashchenko CY, Whitesall SE, D'Alecy LG, Duquaine DC, Brosius FC III, et al. Hypotension, lipodystrophy, and insulin resistance in generalized PPARgamma-deficient mice rescued from embryonic lethality. *J Clin Invest* (2007) 117(3):812–22. doi:10.1172/JCI28859
- Duan SZ, Usher MG, Foley ELIV, Milstone DS, Brosius FC III, Mortensen RM. Sex dimorphic actions of rosiglitazone in generalised peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma)-deficient mice. *Diabetologia* (2010) 53(7):1493–505. doi:10.1007/s00125-010-1748-2
- O'Donnell PE, Ye XZ, DeChellis MA, Davis VM, Duan SZ, Mortensen RM, et al. Lipodystrophy, diabetes and normal serum insulin in PPAR $\gamma$ -deficient neonatal mice. *PLoS One* (2016) 11(8):e0160636. doi:10.1371/journal.pone.0160636
- Nadra K, Quignodot L, Sardella C, Joye E, Mucciolo A, Chrast R, et al. PPARgamma in placental angiogenesis. *Endocrinology* (2010) 151(10):4969–81. doi:10.1210/en.2010-0131
- Hegele RA, Joy TR, Al-Attar SA, Rutt BK. Thematic review series: adipocyte biology. Lipodystrophies: windows on adipose biology and metabolism. *J Lipid Res* (2007) 48(7):1433–44. doi:10.1194/jlr.R700004-JLR200
- Hegele RA. Familial partial lipodystrophy: a monogenic form of the insulin resistance syndrome. *Mol Genet Metab* (2000) 71(4):539–44. doi:10.1006/mgme.2000.3092
- ORPHANET. *FPLD2*. Available from: [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Expert=2348](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=2348)
- ORPHANET. *FPLD3*. Available from: [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=GB&Expert=79083](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=GB&Expert=79083)
- Argmann CA, Cock TA, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: the more the merrier? *Eur J Clin Invest* (2005) 35(2):82–92. doi:10.1111/j.1365-2362.2005.01456.x
- Corton JC, Brown-Borg HM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 in caloric restriction and other models of longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (2005) 60(12):1494–509. doi:10.1093/gerona/60.12.1494
- Luconi M, Cantini G, Serio M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): is the genomic activity the only answer? *Steroids* (2010) 75(8–9):585–94. doi:10.1016/j.steroids.2009.10.012
- Choi SS, Park J, Choi JH. Revisiting PPAR $\gamma$  as a target for the treatment of metabolic disorders. *BMB Rep* (2014) 47(11):599–608. doi:10.5483/BMBRep.2014.47.11.174
- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* (2013) 19(5):557–66. doi:10.1038/nm.3159
- 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) 9(4):478–89. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00574.x
- Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol* (1986) 75:43–88.6. doi:10.1007/978-3-642-82480-7\_2
- Palmer DB. The effect of age on thymic function. *Front Immunol* (2013) 4:316. doi:10.3389/fimmu.2013.0031
- Bertho JM, Demarquay C, Moulian N, Van Der Meer A, Berrih-Aknin S, Gourmelon P. Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell Immunol* (1997) 179(1):30–40. doi:10.1006/cimm.1997.1148
- Falci C, Gianesin K, Sergi G, Giunco S, De Ronch I, Valpione S, et al. Immune senescence and cancer in elderly patients: results from an exploratory study. *Exp Gerontol* (2013) 48(12):1436–42. doi:10.1016/j.exger.2013.09.011
- Fletcher AL, Calder A, Hince MN, Boyd RL, Chidgey AP. The contribution of thymic stromal abnormalities to autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* (2011) 31(3):171–87. doi:10.1615/CritRevImmunol.v31.i3.10
- Yang H, Youm YH, Sun Y, Rim JS, Galbán CJ, Vandanmagsar B, et al. Axin expression in thymic stromal cells contributes to an age-related increase in thymic adiposity and is associated with reduced thymopoiesis independently of ghrelin signaling. *J Leukoc Biol* (2009) 85(6):928–38. doi:10.1189/jlb.1008621
- Youm YH, Yang H, Sun Y, Smith RG, Manley NR, Vandanmagsar B, et al. Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity. *J Biol Chem* (2009) 284(11):7068–77. doi:10.1074/jbc.M808302200
- Kvell K, Varecza Z, Bartis D, Hesse S, Parnell S, Anderson G, et al. Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence. *PLoS One* (2010) 5(5):e10701. doi:10.1371/journal.pone.0010701
- Varecza Z, Kvell K, Talabér G, Miskei G, Csongei V, Bartis D, et al. Multiple suppression pathways of canonical Wnt signalling control thymic epithelial senescence. *Mech Ageing Dev* (2011) 132(5):249–56. doi:10.1016/j.mad.2011.04.007
- Kvell K, Fejes AV, Parnell SM, Pongracz JE. Active Wnt/beta-catenin signaling is required for embryonic thymic epithelial development and functionality *in vivo*. *Immunobiology* (2014) 219(8):644–52. doi:10.1016/j.imbio.2014.03.017
- Kvell K, Pongracz JE. Central immune senescence, reversal potentials. In: Nagata T, editor. *Senescence*. Rijeka, HR: InTech (2012). Chater31 p.
- 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) 183(5):3040–52. doi:10.4049/jimmunol.0900562
- Talaber G, Kvell K, Varecza Z, Boldizsar F, Parnell SM, Jenkinson EJ, et al. Wnt-4 protects thymic epithelial cells against dexamethasone-induced senescence. *Rejuvenation Res* (2011) 14(3):241–8. doi:10.1089/rej.2010.1110
- Meggyes M, Lajko A, Palkovics T, Totimon A, Illes Z, Szereday L, et al. Feto-maternal immune regulation by TIM-3/galectin-9 pathway and PD-1 molecule in mice at day 14.5 of pregnancy. *Placenta* (2015) 36(10):1153–60. doi:10.1016/j.placenta.2015.07.124
- Solti I, Kvell K, Talaber G, Veto S, Acs P, Gallyas F Jr, et al. Thymic atrophy and apoptosis of CD4+CD8+ thymocytes in the cuprizone model of multiple sclerosis. *PLoS One* (2015) 10(6):e0129217. doi:10.1371/journal.pone.0129217
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* (2004) 22:745–63. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702
- Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* (2009) 30(7):366–73. doi:10.1016/j.it.2009.04.003
- Simioni PU, Fernandes LG, Gabriel DL, Tamashiro WM. Induction of systemic tolerance in normal but not in transgenic mice through continuous feeding of ovalbumin. *Scand J Immunol* (2004) 60(3):257–66. doi:10.1111/j.0300-9475.2004.01454.x
- de Faria AM, Ficker SM, Speziali E, Menezes JS, Stransky B, Silva Rodrigues V, et al. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mech Ageing Dev* (1998) 102(1):67–80. doi:10.1016/S0047-6374(98)00024-4
- Kato H, Fujihashi K, Kato R, Dohi T, Fujihashi K, Hagiwara Y, et al. Lack of oral tolerance in aging is due to sequential loss of Peyer's patch cell interactions. *Int Immunol* (2003) 15(2):145–58. doi:10.1093/intimm/dxg011
- Ramirez A, Co M, Mathew A. CpG improves influenza vaccine efficacy in young adult but not aged mice. *PLoS One* (2016) 11(3):e0150425. doi:10.1371/journal.pone.0150425
- Hofer J, Hofer S, Zlamy M, Jeller V, Koppelstaetter C, Brandstätter A, et al. Elevated proportions of recent thymic emigrants in children and adolescents with type 1 diabetes. *Rejuvenation Res* (2009) 12(5):311–20. doi:10.1089/rej.2009.0863

44. Iskakova S, Urazayev O, Bekmukhambetov Y, Dworacki G, Dworacka M. [The differences of TREC (T-cell receptor excision circles) concentration in type 2 diabetic patients]. *Georgian Med News* (2015) (244–245):29–36.
45. Song F, Guan Z, Gienapp IE, Shawler T, Benson J, Whitacre CC. The thymus plays a role in oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* (2006) 177(3):1500–9. doi:10.4049/jimmunol.177.3.1500
46. Galipeau HJ, Verdu EF. Gut microbes and adverse food reactions: focus on gluten related disorders. *Gut Microbes* (2014) 5(5):594–605. doi:10.4161/19490976.2014.969635
47. Marietta EV, Murray JA. Animal models to study gluten sensitivity. *Semin Immunopathol* (2012) 34(4):497–511. doi:10.1007/s00281-012-0315-y
48. MacDonald TT. Evidence for cell-mediated hypersensitivity as an important pathogenetic mechanism in food intolerance. *Clin Exp Allergy* (1995) 25(Suppl 1):10–3. doi:10.1111/j.1365-2222.1995.tb01125.x
49. Ferguson A, Ziegler K, Strobel S. Gluten intolerance (coeliac disease). *Ann Allergy* (1984) 53(6 Pt 2):637–42.
50. Cromer D, van Hoek AJ, Jit M, Edmunds WJ, Fleming D, Miller E. The burden of influenza in England by age and clinical risk group: a statistical analysis to inform vaccine policy. *J Infect* (2014) 68(4):363–71. doi:10.1016/j.jinf.2013.11.013
51. Ang LW, Lim C, Lee VJ, Ma S, Tiong WW, Ooi PL, et al. Influenza-associated hospitalizations, Singapore, 2004–2008 and 2010–2012. *Emerg Infect Dis* (2014) 20(10):1652–60. doi:10.3201/eid2010.131768
52. Haq K, McElhaney JE. Immunosenescence: influenza vaccination and the elderly. *Curr Opin Immunol* (2014) 29:38–42. doi:10.1016/j.coi.2014.03.008
53. Thangavel RR, Bouvier NM. Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology. *J Immunol Methods* (2014) 410:60–79. doi:10.1016/j.jim.2014.03.023
54. Kim JI, Park S, Lee S, Lee I, Heo J, Hwang MW, et al. DBA/2 mouse as an animal model for anti-influenza drug efficacy evaluation. *J Microbiol* (2013) 51(6):866–71. doi:10.1007/s12275-013-3428-7
55. Kamal RP, Katz JM, York IA. Molecular determinants of influenza virus pathogenesis in mice. *Curr Top Microbiol Immunol* (2014) 385:243–74. doi:10.1007/82\_2014\_388
56. Shekarabi M, Asgari F. In: Massoud A, Rezaei N, editors. *Immunology of Aging*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag (2014).
57. Greene ME, Pitts J, McCarville MA, Wang XS, Newport JA, Edelstein C, et al. PPARgamma: observations in the hematopoietic system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2000) 62(1):45–73. doi:10.1016/S0090-6980(00)00075-7
58. Gross JC, Boutros M. Secretion and extracellular space travel of Wnt proteins. *Curr Opin Genet Dev* (2013) 23(4):385–90. doi:10.1016/j.gde.2013.02.017
59. Lundberg V, Berglund M, Skogberg G, Lindgren S, Lundqvist C, Gudmundsdottir J, et al. Thymic exosomes promote the final maturation of thymocytes. *Sci Rep* (2016) 6:36479. doi:10.1038/srep36479

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article. The research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Ernszt, Banfai, Kellermayer, Pap, Lord, Pongracz and Kvell. 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) or licensor 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.