

PhD thesis

**A Wnt mikro környezet közvetlenül szabályozza a tüdő öregedéséhez vezető
molekuláris eseményeket**

Kovács Tamás

PhD témavezetők: Prof. Dr. Pongrácz E. Judit

Dr. Kvell Krisztián

PhD Program Vezető: Prof. Dr. Németh Péter



Pécsi Tudományegyetem

Gyógyszerészi Biotechnológia Tanszék

Pécs

2015

Bevezetés

Az öregedésről általában

Az öregedő populáció arányának növekedése már ebben az évszázadban is hatalmas nyomást fog gyakorolni a társadalomra, különösen az egészségügyre, a munkaerő piacra és a nyugdíjrendszerre.

Az EU27 tagállamában kivétel nélkül minden ország küzd ezzel a problémával. A 2008-ban mért medián átlagéletkor (40,7 év) 2060-ra már 47,9 év lesz. A 65 év felettek aránya pedig 17,1%-ról (84,6 millió humán 2008-ban) 30%-ra (151,5 millió) fog emelkedni 2060-ra.

A tüdő öregedése

Az öregedés során a tüdő teljes tömege csökken a kapillárisok számával együtt. Az új alveolusok kialakulása is korlátozódik. Az öregedés előrehaladtával a tüdőszövet hajlamossá válik a fibrózisra, fertőző és tumoros megbetegedésekre egyaránt. Különböző tanulmányok kimutatták, hogy az öreg tüdőre jellemző a szerzett emfizémára hasonlító légtermegnagyobbodás, ami 50 éves kor felett a nem dohányzó egészséges felnőttekben is kimutatható.

Míg más szervek, szervrendszerek öregedése jól tanulmányozott, addig a tüdő öregedésének molekuláris hátteréről keveset tudunk. A legtöbb vizsgálatot és tanulmányt egereken végeztek el és habár hasonlít az emberben lejátszódó folyamatokhoz, mint például a légtermegnagyobbodás, azonban az egerek nem a legjobb modell élőlények a molekuláris változások és mikro környezet tanulmányozására. Nem minden élettani folyamat egyezik ugyanis az egerek és az emberek légző rendszerének öregedése során. Például egerekben az öregedés is hamarabb játszódik le, és gyorsabban is megy végbe, mint az emberekben.

A normál tüdő funkciója

Az alveolusok a gáz csere színtere, melyben két különböző epitél sejt található. Az egyes (ATI) és a kettes típusú (ATII) alveoláris epitél sejtek. Az egyes típusú alveoláris epitél sejtek szerepe viszonylag egyszerű, a gázcsere megy keresztül ezeken a nagyon vékony sejteken. A kettes típusú alveoláris epitél sejtek funkciója azonban ennél sokkal bonyolultabb. Egyrészt ők termelik a szörfaktáns (SFP) fehérjéket. Ezek a fehérjék lipoproteinek és csökkentik a felületi feszültséget az alveolusokban. Ezen kívül az ATII-es sejtek rendelkeznek őssejt funkcióval is. Ők a fakultatív progenitor sejtek a tüdő alveoláris régiójában. Azon kívül, hogy

képesek megújítani saját magukat, in vitro körülmények között már bizonyították, hogy képesek ATI-es sejtekké is alakulni.

A funkciójuk megtartásához elengedhetetlen triglicerideket azonban önállóan nem, vagy csak kis mértékben képesek felvenni a véráramból. A triglicerideket a lipofibroblasztok szolgáltatják az ATII-es sejteknek. A lipofibroblasztok, vagy lipid-hordozó fibroblasztok az ATII-es sejtek mellett találhatóak a tüdő alveoláris régiójában. A lipid felhalmozását a peroxiszóma osztódását aktiváló receptor gamma (PPAR γ) és a zsírirányú differenciálódáshoz köthető fehérje (ADRP) szabályozzák. PPAR γ hiányában a lipofibroblasztok myofibroblasztokká alakulnak, melyek már nem képesek lipideket továbbítani az ATII sejtek irányába, tehát nem képesek fenntartani a normál tüdőfunkciót. A lipofibroblasztok csökkent száma különböző tüdőbetegségekhez vezethet, mint például a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) vagy a tüdő fibrózis.

PPAR γ

A peroxiszóma proliferátor aktivált receptorok a nukleáris hormon receptor szupercsaládba tartoznak, melyek transzkripció faktor szinten széles körben szabályoznak különböző élettani folyamatokat. PPAR γ az egyike a PPAR receptoroknak és számos szövetben expresszálódik.

PPAR γ legnagyobb mennyiségben a fehér és a barna zsírszövetben expresszálódik, ahol a fő szabályozója az adipogenezisnek, egy potens modulátora a zsír metabolizmusnak és az inzulin érzékenységnek az egész testben. Számos szövetben leírták már a PPAR γ jelenlétét, így a tüdőben is.

A posztnatális tüdő fejlődésében szerepet játszó PPAR γ megtalálható mind a tüdő epitél és fibroblaszt típusú sejtjeiben. A PPAR γ az epitél, azaz hámsejtek differenciációjáért felelős molekula, mely a tüdő struktúrájának kialakításában és a gyulladós folyamatok kontrollálásában is szerepet játszik. Míg a fibroblaszt sejtek esetében a lipofibroblaszt irányú differenciálódásban elengedhetetlen molekula a PPAR γ .

Wnt-ok és a béta(β) katenin útvonal

A Wnt család 19 szekretált glyco-proteint tartalmaz, amelyek számos fejlődésben fontos folyamatot szabályoznak. Két fő jelátviteli útvonal különíthető el: a kanonikus és a nem-kanonikus útvonal. A Wnt fehérjék receptorai a Frizzled molekulák.

Általánosan a kanonikus Wnt molekula hiányában, a glikogén szintáz kináz 3 β (GSK3 β) összeköttetésben az APC molekulával és az axin fehérjével foszforilálja a citoplazmában található β -catenin molekulát. A foszforilált β -catenin ubiquitinálódik majd lebomlik a proteozómában. Azonban Wnt molekula jelenlétében a disheveled (Dvl) komplex aktiválódik és foszforilálja GSK-3 β -APC-axin komplexet. Ez a folyamat a β -catenin akkumulációjához vezet a citoplazmában. Később a β -catenin a magba vándorol és különböző transzkripció folyamatokban vesz részt.

Anyagok és módszerek

Etikai engedély

A tüdő szövetmintákat a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Intézete biztosította számunkra. A projekt az Egyetem Etikai Bizottsága jóváhagyta. A páciensek írásos beleegyezésükkel hozzájárultak, hogy a mintáikat kutatási célokra használjuk. A mintákat név nélkül kezeltük.

Állatok

A kísérleteinkhez beltenyésztett Balb/C albínó egér törzset használtunk mindkét nemből. Az egerek standardizált körülmények között éltek, ahol a táplálék és az ivóvíz szabadon rendelkezésükre állt. Az állatokat 1, 3, 6, 12, 18, 24 hónapos korokban áldoztuk fel.

Sky scan microCt

Az egereket elaltattuk Na-pentobarbituráttal (eutazol) és a SkyScan 1176 microCt-be helyeztük. A gép 11 megapixeles kamerával felszerelt egysége a légzésük alatt felvételeket készített.

Tüdősejtek izolálása

Az egerek tüdejét altatás után perfundáltuk a jobb kamrán keresztül foszfát pufferrel (PBS), hogy csökkentsük a tüdő vértartalmát. Majd a tüdőt eltávolítottuk és megtisztítottuk a kötőszövetről. Ezután kisebb darabokra vágtuk és folyamatos keverés mellett kollagenáz-diszpáz-DNáz oldatban 50 percen keresztül emésztettük. Az emésztett tüdő sejteket 70µm –es sejtszűrőn átszűrtük.

Tüdősejtek szortolása

A tüdőből készült egysejtes szuszpenziót megjelöltük CD45-FITC-el (Pécsi Tudományegyetem, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet) és anti-EpCAM1 antitesttel, amit korábban phycoeritrinnel konjugáltattunk (G8.8 clone ATCC). A sejtszortolás FACS Aria III (BectonDickinson) sejtszorter segítségével történt.

Sejtvonalak

A kísérletekhez TEP1 és Wnt4 overexpresszáló TEP1 sejtvonalak felülűszoít használtuk. A sejtek DMEM (Dulbecco által módosított Eagle medium, Lonza) médiumban növekedtek

melyhez 10% FCS-t, penicillint, streptomicynt és beta mercaptoethanolt adtunk hozzá. A sejtek 37°C-os nedvesített termosztátban, ahol a CO₂ koncentráció 5%.

Háromdimenziós (3D) emberi tüdő szövet kultúrák

A háromdimenziós emberi humán tüdő szövet kultúrákat Prof. Pongrácz E. Judit által szabadalmaztatott protokollal készítettük és kis légúti tüdő hámsejtekből (SAEC) és normál humán tüdő fibroblasztokból áll. Mindkét sejt humán primer tüdő sejt és a Lonza árusítja. A két sejtípus a Lonza által biztosított epiteliális növekedési médiumban (SAGM) és fibroblaszt növekedési médiumban (FGM) növekedett, majd a háromdimenziós szövetkultúrákhoz ezek 1:1 arányú keverékét használtuk.

Rekombináns Adeno (rAd) és Lenti (L) virális konstrukciók és a velük történő infekció építél és fibroblaszt sejtekbe.

Az ICAT szekvenciát polimeráz lánc reakció során felsokszorosítottuk a 5' ATGAACCGCGAGGAGCA-3' és a 5'-CTACTGCCTCCGGTCTTCC-3' primer szekvenciák segítségével és egy bi-cisztronikus GFP (zöld fluoreszcens fehérje) Adeno Shuttle és Lenti WPTS vektorokba klónoztuk. A Shuttle vektort homológ rekombinációval adenovirális vektorba klónoztuk. Az adenovírusokat a 293 csomagoló sejt vonal készítette miután a linearizált plazmid DNS-eket Lipofectamine 2000 segítségével a sejtekbe transzfektáltuk. A vírusokat adenovirális tisztító kittel (BD Bioscience) tisztítottuk és koncentráltuk.

Western blot analízis

A fiatal és az öreg tüdő szöveteket jégen 20 percen keresztül lizáltuk lízispufferben (20mM HEPES pH 7.4, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂ 137mM NaCl, 50mM β-glycerophosphate, 2mM EGTA, 1% Triton X100 supplemented with 1mM DTT, 2mM PMSF, 2 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml pepstatine), majd folyékony nitrogénben megfagyasztottuk és -80°C-on tároltuk. Mielőtt 10%-os SDS-PAGE géltre töltöttük, a mintákat felforraltuk 2x SDS minta pufferben. A fehérje koncentrációkat bicinchoninic-acid esszével mértük (Sigma), a géltre ugyanakkora mennyiségű fehérjét töltöttünk, ami aztán nitrocellulóz membránra vittünk át. A membránokat 1%-os BSA és 0,05%-os Tween, TBS pufferben blokkoltuk. Az elsődleges antitesttel egy éjszakán át inkubáltunk (anti-β-katenin, anti-Wnt4 antitestek, 1:1000-es hígítással, mindkét antitest a Santa-Cruz-tól származik). Másodlagos antitestként anti-egér és anti-kecske HRPO konjugált antitesteket használtunk 1:1000-es hígításban. A

blottok vizualizálásához kemilumineszcens Supersignal kittet használtunk és denzitometriával kvantifikáltuk (LAS 4000).

RNS izolálás

A sejtmintákat RA1 pufferben homogenizáltuk, majd az RNS izolálást a NucleospinII RNS izoláló kittel hajtottuk végre. A DNS emésztés az oszlopon történt RNáz mentes DNáz segítségével. A tisztított RNS koncentrációját Nanodroppal mértük le (Thermo Scientific).

Valós-idejű kvantitatív PCR

Magas kapacitású cDNS író kit segítségével szintetizáltunk az RNS-ből cDNS-t, 1 ug teljes RNS-t felhasználva a gyártó ajánlása alapján. A reverz transzkripció 20ul teljes térfogatban random primerekkel történt. A valós idejű kvantitatív PCR reakció a gén expresszió analízisére szolgált. A reakcióhoz ABSolute qPCR SYBR Green low Rox mixet és gén specifikus 100 nM primereket használtunk. Az eredményeket β -aktin génhez normalizáltuk. A primer szekvenciák az alábbi táblázatban láthatóak. A PCR kondíciók a következők voltak: 95°C 15 percig, majd 40 cikluson keresztül 95°C 15 másodpercig, a primerek kötődése 58°C-on történt majd a TAQ polimeráz 72°C-on 1 percig írta a szekvenciákat. Minden egyes reakcióban a disszociációs görbe analízisével ellenőriztük az adott termék specifikus amplifikációját. Az eredményeket a ddCt módszerrel határoztuk meg a következő módon: az átlag Ct értékeket a parallel minták átlagából számoltuk. A dCt értékeket úgy kaptuk meg, hogy az érdeklődésünkbe tartozó gén Ct értékéből kivontuk a háztartási gén (jelen esetben β -aktin) Ct értékét. A ddCt érték a különbség az öreg és a fiatal dCt értékek között. A relatív mennyiséget pedig a következő formulával számoltuk ki: $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$

Primer szekvenciák

Primerek	Forward	Reverse
egér primerek		
egér β -Aktin	TGGCGCTTTTGACTCAGGA	GGGAGGGTGAGGGACTTCC
egér PTHrPR	GGCGAGGTACAAGCTGAGAT	ACACTTGTGTGGGACACCAT
egér Wnt4	CTCAAAGGCCTGATCCAGAG	TCACAGCCACACTTCTCCAG
egér Wnt5a	AAGCAGGCCGCTAGGACAGTA	CGCCGCGCTATCATACTTCT
egér Wnt11	GCTCCATCCGCACCTGTT	CGCTCCACCACTCTGTCC
egér PPAR γ	CCCAATGGTTGCTGATTACAAA	AATAATAAGGTGGAGATGCAGG TTCT
egér ADRP	CGCCATCGGACACTTCCTTA	GTGATGGCAGGCGACATCT
egér Sirt1	GACGATGACAGAACGTCACA	GATCGGTGCCAATCATGAGA

egér Sirt7	TGAGACAGAAGAGGCTGTCTG	TGGATCCTGCCACCTATGTC
humán primerek		
humán β -Aktin	GCGCGGCTACAGCTTCA	CTTAATGTCACGCACGATTCC
humán PPAR γ	GGTGGCCATCCGCATCT	GCTTTTGGCATACTCTGTGATCTC
humán S100A4	TGGAGAAGGCCCTGGATGT	CCCTCTTTGCCCGAGTACTTG
humán IL1 β	TCAGCCAATCTTCATTGCTCAA	TGGCGAGCTCAGGTACTTCTG

Immunfluoreszcencia

Az egerek intraperitoneális altatását követően a jobb kamrán keresztül perfundáltuk foszfát pufferrel (PBS). A tüdők in vivo körülmények között a tracheán keresztül kriosztát beágyazó médium és PBS 1:1 arányú keverékével töltöttük fel, és -80°C fagyasztottuk le. A metszés Leica kriosztáttal történt a metszetek vastagsága 7-9 μ m.

A humán minták a feldogozásig 1% FCS-t tartalmazó PBS-ben tartottuk szobahőmérsékleten. A feltöltés, fagyasztás és a metszés a korábban tárgyaltak alapján történt.

A 3D humán tüdőszövetek esetében a kezelés végén óvatosan eltávolítottuk a 24 lyukú plate-ről és TissueTek kriosztát beágyazó médiumban fagyasztottuk le -80°C-ra.

A későbbi hisztológiai megfigyelésekhez a 7-9 μ m vastagságú metszeteket hideg acetonban fixáltuk 10 percig.

Antitestek és fluoreszcens festés

A fixálás után a metszeteket 5%-os BSA oldatban telítettük 20 percen keresztül, majd az immunfluoreszcens festést végeztük el megfelelő antitestek segítségével. Az egér mintákhoz anti-Wnt5a (Santa Cruz) és anti-EpCAM1-FITC (clone G8.8 ATCC) antitesteket használtunk, míg a humán mintákhoz anti-SPC (Millipore) antitestet, a 3D humán tüdőszöveti modellhez pedig anti-KRT7 (DAKO), anti-E-kadherin (AbCam) és anti-SPC antitesteket használtunk. A szöveteken mindig 1 órát inkubáltunk az elsődleges antitestekkel.

A másodlagos antitestek northern light anti-egér NL493 és anti-nyúl NL557 (R&D systems) voltak. Az elsődleges antitesttel történt inkubálás és az azt követő mosás után, a szöveteket a másodlagos antitestekkel 1 órán át inkubáltuk. A sejtmagokat DAPI (Serva) magfestékkel jelöltük. A képeket CCD kamerával felszerelt Olympus IX81 fluoreszcens mikroszkóppal készítettük. A későbbi kép feldolgozásához az ImageJ szoftvert használtuk. A fluoreszcens

képeket a StrataQuest programmal is analizáltuk, mellyel az intenzitás különbségeket állapítottuk meg.

Hematoxylin-Eozin festés

A metszést követően a mintákat rögtön megfestettük Hematoxylinnal és Eozinnal. A képek a Panoramic Desk géppel (3D histech) készültek és a Panoramic viewer programmal analizáltuk őket (3D histeh).

Neutrális zsírfestés

Az egér tüdő metszeteket hideg acetonban fixáltuk majd anti-EpCAM1-FITC antitesttel festettük meg. A festést követően LipidTox (Life technologies Inc.) festést végeztünk el, amivel a neutrális zsírokat tettük láthatóvá. A fluoreszcens képeket a korábbiakhoz hasonlóan készítettük és analizáltuk.

Statisztikai analízis

Az adatokat átlag \pm átlagos eltéréssel ábrázoltuk, amikor lehetőség volt rá. A különbségeket a kísérleti csoportok között a Student féle T-teszttel állapítottuk meg, ahol szignifikáns eredménynek a $p \leq 0,05$ tekintettük. A normál eloszlást Kolmogorov-Smirnoff teszttel állapítottuk meg.

Eredmények

Morfológiai változások az öregedő tüdőben

A tüdő funkciója az öregedés során folyamatosan romlik a tüdő gyulladási folyamatainak és a strukturális változásoknak köszönhetően. Az irodalomban erre a folyamatra, mint az öregedéssel járó emfizémaként hivatkoznak. A mikro komputeres tomográfiás és a hematoxylin-eozin vizsgálatunk kimutatták a megnövekedett légteret mind az egér, mind pedig a humán szövetben.

Hogy igazolni tudjuk az epiteliális réteg degenerációját, „egysejtes” szuszpenziót hoztunk létre az egér tüdőszövetből és a sejteket FACS-AriaIII sejt szorter segítségével szétválasztottuk EpCAM1 és CD45 pozitivitás alapján. A sűrűség plottok analízisa rávilágított, hogy a CD45+ sejtek száma szignifikánsan megemelkedett, míg az EpCAM1+ sejtek száma szignifikánsan csökkent az öreg tüdőben a fiatalhoz hasonlítva.

Mind a PPAR γ és a lipid expressziós szintek csökkennek öregedés során

Amíg az öregedéssel járó krónikus gyulladás miatt kialakuló szöveti károsodás érhető folyamat, addig a nem hatékony szöveti regeneráció már kevésbé. Mivel a lipofibroblasztok esszenciális sejtek az ATII-es fakultatív őssejtek fenntartásában molekuláris vizsgálatoknak vetettük alá a sejteket. Először a zsír irányú differenciációhoz és egyben a lipofibroblasztok életben maradásához elengedhetetlen PPAR γ és ADRP mRNS expressziós szinteket vizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy mind a kettő molekula csökkent szintet mutat az öreg sejtekben a fiatalhoz képest a szortolt EpCAM1 pozitív (hám jellegű sejtek) és a szortolt EpCAM1 negatív (további, zömmel mezenchimális jellegű sejtek) sejtekben egyaránt. A valós idejű kvantitatív PCR eredményeket először neutrális zsírfestéssel igazoltuk. Eredményeinken jól látszik, hogy az egy hónapos egér tüdejében sokkal több zsír található és ezek a zsírcseppek kolokalizációt mutatnak a sejtekkel, míg az öreg tüdőben csak nagy zsírlerakódások láthatóak a sejteken kívül. A PPAR γ fehérje csökkenésére western-blot reakciót is elvégeztünk. Ennek eredménye, hogy a fiatal egér (1 hónapos) tüdeje sokkal több PPAR γ fehérjét tartalmaz az öreg egér (24 hónapos) tüdejéhez hasonlítva. Ez az eredmény utal az öregedéssel járó PPAR γ fogyásra.

Az irodalom alapján a paratireoid hormonnal összefüggő fehérje receptora, a PTHrP receptor, egy potenciális markere, egyben elengedhetetlen receptora a lipofibroblaszt sejteknek. Ezért az EpCAM1 negatív sejtekben megmértük a PTHrP receptor mRNS szintjét mind fiatal mind

pedig öreg egér tüdejében azzal az eredménnyel, hogy a 24 hónapos egér sejtek sokkal kevesebb PTHrP receptort tartalmaznak, mint a fiatal sejtek.

A Wnt mikrokönyezet megváltozása tüdő öregedése során

Új keletű tanulmányok igazolták a Wnt szignál molekulák fontosságát a PPAR γ aktivitásban. Takada 2009-ben leírta, hogy kanonikus Wnt-ok antagonizálják a PPAR γ hatását oszteoblaszt differenciációban. Saját munkacsoportunk azt is kimutatta, hogy a Wnt4 túltermeltetése TEP1 tímusz epitél sejtvonalban a PPAR γ expresszió csökkenését eredményezte.

Öregedő tüdőben számos Wnt közül a Wnt4 emelkedett szintet mutatott mind a 24 hónapos EpCAM1 pozitív és negatív sejtekben és a Wnt5a emelkedett szintet mutatott az EpCAM1 negatív, tehát a fibroblaszt jellegű sejtekben. A PCR eredmények igazolására western-blot reakcióban kimutattuk, hogy a Wnt4 fehérje is megemelkedik az öreg egér tüdő mintákban. A Wnt5a-t pedig immunfluoreszcens festéssel mutattuk ki fiatal (21 éves) és öreg (73 éves) humán tüdő metszeteken. A 73 éves humán tüdőben a Wnt5a erősebb expressziót mutat.

A PPAR γ expresszió β -katenin-függő változása

A korábbi eredményeink és irodalmi adatok által leírt adatok azt sugallják, hogy a kanonikus Wnt szignál út vonal szabályozza a PPAR γ expressziót. Mivel, mind a Wnt4, Wnt5a és Wnt11 képes aktiválni a kanonikus út vonalat a Wnt4 molekulára fókuszáltunk, mert a Wnt4 mRNS mind az epiteliális, mind a fibroblaszt jellegű sejtekben is emelkedett szintet mutatott. Azért, hogy képesek legyünk a Wnt molekulák által történő változásokat nyomon követni 3D in vitro humán tüdő szferoidokat használtunk. A 3D tüdő szöveteket Wnt4-et tartalmazó TEP1 felülúszóval kezeltük egy héten keresztül, majd valós idejű kvantitatív PCR reakcióval megmértük a PPAR γ expressziót. A Wnt4 által kezelt tüdő szövetekben a PPAR γ expressziója csökkent a ctrl felülúszóval kezelt szövetekhez képest. Kismolekulákat ezen belül LiCl-t 10mM-os koncentrációba (Wnt β -katenin aktivátor) és IWR-t 1 μ M-os koncentrációban (Wnt β -katenin inhibitor) használva azt tapasztaltuk, hogy a β -katenin serkentése is képes csökkenteni a PPAR γ expressziót, míg a β -katenin gátlása enyhe emelkedést eredményezett a PPAR γ mRNS expressziójában. Később NHLF sejteket kezeltünk LiCl-dal és IWR-rel majd western-blot reakcióban a β -katenin expresszióját vizsgálva fény derült arra, hogy a LiCl képes a Wnt4-hez hasonlóan aktiválni a β -katenin akkumulációt, míg az IWR csökkentette a β -katenin szintjét a sejtekben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a szervezetben a megnövekedett Wnt4 expresszió csökkenti a PPAR γ

fehérje szintjét kanonikus Wnt/ β -catenin útvonalon keresztül, és ez a változás a lipofibroblasztok számának csökkenésével is együtt jár. Ahhoz azonban, hogy megvizsgáljuk, hogy az epitel sejtek számát is csökkenti-e a PPAR γ fehérjének a redukciója, pro-szörfaktáns C fehérje festést végeztünk a Wnt4-gyel kezelt 3D tüdő szöveteinken. Egy hét kezelés után immunfluoreszcens képen azt tapasztaltuk, hogy az SPC festődés alacsonyabb szintet mutat a kezelt szövetekben.

A tüdő epitel sejtekben alacsony β -catenin aktivitás szükséges a pro-SPC termeléshez

A korábbi eredmények támogatják, hogy a megfelelő PPAR γ szint szükséges a lipofibroblasztok kialakulásához és az ATII-es sejtek SPC termelésének a fenntartásához az továbbra sem tisztázott, hogy vajon a PPAR γ aktivitás szükséges-e az ATII-es sejtek SPC termeléséhez. Ez egy fontos kérdés annak fényében, hogy a PPAR γ csökken az öregedés során és ez a fibroblasztok mellett az epitel sejteket is érinti. Mivel az öregedés során SPC termelés csökken az öreg humán tüdőben, a PPAR γ aktivitás ugyanolyan fontos lehet az epitel sejtekben mint a fibroblasztokban.

Ezért a β -catenin aktivitást ICAT gén túltermelésével blokkoltuk. Az ICAT specifikus inhibitora a Wnt/ β -catenin útvonalnak. Az ICAT gént mind a hám mind pedig a fibroblaszt sejtekbe bejuttattuk adeno és lentivírusokat felhasználva, majd 3 dimenziós in vitro humán tüdő szövetet készítettünk.

Adeno vírusokat használtunk annak érdekében, hogy specifikusan a SAEC sejtekbe juttassuk az ICAT gént, míg az NHLF sejtek esetében lenti vírusokat használtunk, és a sejteket már 2 dimenziós kultúrában megfertőztük a vírussal, a 3D-s szövetet csak később már a vírust tartalmazó sejtekkel készítettük. Hét napos inkubálás után mRNS szinten a PPAR γ drasztikus emelkedését tapasztaltuk. Fluoreszcens festéssel pedig a Pro-SPC fehérje szintjének emelkedését tudtuk kimutatni a vírussal kezelt szövetekben a kontroll szövetekhez képest.

Wnt jelátvitel a myofibroblaszt-szerű differenciáció során

Korábbi tanulmányok szerint a PTHrP receptor expressziójának és a lipid tartalmának csökkenése jó indikátora a lipofibroblaszt myofibroblaszt átalakulásnak. A mi eredményeink alátámasztják ezeket a korábbi megfigyeléseket, mert a PTHrP receptor szintje csökkent mRNS szinten az öreg egerek tüdejének nem epiteliális jellegű sejtjeiben. Azért, hogy kiderítsük a Wnt mikro környezet szerepet játszik-e a megnövekedett myofibroblaszt irányú differenciációban, Wnt4 és Wnt5a kezelt 3 dimenziós tüdő szövetekben és az NHLF

megmértük az S100A4 mRNS változását. Azt tapasztaltuk, hogy mind a Wnt4 mind pedig a Wnt5a hatására az S100A4 mRNS emelkedett szintet mutat, ami jelzi a megnövekedett myofibroblaszt differenciációt.

A tüdő öregedésének epigenetikai szabályozása

Elfogadott tény, hogy a környezeti faktorok befolyásolják az öregedést, ezért feltételezhető, hogy az epigenetikai mechanizmusok szintén hatással lehetnek a tüdő öregedésére. A sirtuin molekulákat gyakran említik az öregedéssel és az öregedéssel járó folyamatokkal együtt. Azért, hogy felfedjük a funkciójukat a tüdő öregedése során a sirtuin molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk. Mind az EpCAM pozitív mind pedig az EpCAM negatív sejtekben megmértük az expressziós különbségeket és azt tapasztaltuk, hogy az öreg tüdő sejtekben megemelkedett a sirtuin expresszió. A sirtuin7 (Sirt7) majdnem kétszeresére változott a 24 hónapos egér tüdősejtjeiben az 1 hónaposhoz képest. Habár mRNS szinten a Sirt7 mutatott nagyobb emelkedést fehérje szinten kimutathatatlan volt, azonban a Sirt1 fehérje szintje szignifikánsan megemelkedett az öreg humán tüdő metszeteken a fiatalhoz képest. Az általánosan elfogadott nézet szerint a Sirt1 az öregedés ellen hat, ezért érdekes az emelkedett Sirt1 szint az öregedő emberi tüdőben. Újabb tanulmányok kimutatták azonban, hogy Sirt1 az adipogenezis ellen is hat mégpedig úgy, hogy gátolja a PPAR γ fehérje funkcióját. Annak érdekében, hogy kiderítsük a Sirt1 hatását a tüdő öregedésére, a Sirt1 mimetikus rezveratrolt használtuk. A rezveratrolt Wnt4-gyel együtt használtuk, mert korábbi kísérleteink bizonyították, hogy a Wnt4 képes aktiválni a β -katenin útvonalat és ezzel gátolni a PPAR γ funkcióját. Mind a rezveratrol, mind pedig a Wnt4 csökkentette a PPAR γ expresszióját és a hatásuk összegződött az együttes kezelés során.

Konklúzió

A tüdő alveoláris régiója megváltozik az öregedés során és a hasznos légző felület csökken.

A Wnt mikrokönyezet is változik az öregedéssel. Amíg a Wnt4 mRNS emelkedik mind a hám mind pedig a nem hám jellegű sejtekben, a Wnt5a molekula a nem hám jellegű sejtekben emelkedik.

A Wnt molekulákkal ellentétben, a PPAR γ és az általa irányított ADRP molekula expressziós szintje csökkent mind a hám mind pedig a nem hám jellegű sejtekben. Ezek a molekulák nagyon fontosak az adipogenezisben általában és az ATII-es sejtek megfelelő működéséért felelős lipofibroblasztok életében is elengedhetetlenek.

A PPAR γ expresszió szabályozása egy kanonikus vagy β -katenin-függő folyamat.

A Wnt4 és a Wnt5a is emeli mRNS szinten az S100A4 myofibroblaszt marker szintjét és csökkenti a PTHrP lipofibroblaszt marker expresszióját. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy lipofibroblaszt-myofibroblaszt átalakulás zajlik az öregedő tüdőben.

A megnövekedett myofibroblaszt jelenlét az öregedő tüdőben eredményezhet emfizéma-szerű elváltozásokat, csökkent légzőfelületet és ennek következtében kialakuló légzési nehézséget.

A Sirt1 és a Sirt7 is emelkedett szintet mutat egerekben, de csak a Sirt1 fehérje mutatható ki öreg emberi tüdőben. Mivel a Sirt1 gátolja a PPAR γ aktivitását, elősegíti a lipofibroblaszt-myofibroblaszt átalakulást, elősegítve ezzel az öregedési folyamatot.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof Pongrácz E. Juditnak a kitűnő témavezetésért, a törődésért, a türelemért és hogy ilyen kiváló környezetet biztosított a kutatásaimhoz. Nélküle nem lettem volna képes befejezni a PhD dolgozatomat.

Továbbá szeretném megköszönni másik témavezetőmnek, Dr. Kvell Krisztiánnak a segítséget a laboratóriumi munkám során. Tanácsai mindig hozzásegítettek a felmerülő problémák megoldásához.

Szeretnék köszönetet mondani a kollégáimnak, különösen Csöngői Veronikának, Ernszt Dávidnak és Feller Diánának, akik mindig mellettem voltak a laborban és nagyszerű beszélgetéseket folytattunk a késő éjszakába nyúló kísérletek során.

Természetesen köszönöm minden kollégámnak a Gyógyszerészi Biotechnológia tanszéken és az Immunológia és Biotechnológia Intézetben a munkám során nyújtott segítséget.

Végül szeretném megköszönni a családomnak és barátaimnak a támogatást és bátorítást, amit tanulmányaim során kaptam tőlük.

Publikációs lista

Teljes impact faktor: 9.669

Teljes citációs szám: 6

A dolgozat a következő publikációkon alapszik

Kovacs, T., Csongei, V., Feller, D., Ernszt, D., Smuk, G., Sarosi, V., Jakab, L., Kvell, K., Bartis, D. and Pongracz, J. E. (2014), Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence. *Aging Cell*, 13: 838–849. doi: 10.1111/accel.12240 (IF: 5.939)

Kovacs, T., Feller, D., Ernszt, D. Rapp J., Sarosi, V., Kvell, K., and Pongracz, J. E. Epigenetic regulation of pulmonary senescence. Submitted to *Mechanisms of Ageing and Development* (IF: 3.510).

A dolgozat a következő konferencia előadásokon és posztereken alapszik

Előadások:

Kovács T., Kvell K, Willert K, Pongrácz J.E: The functional test of Wnt protein. First International Doctoral Workshop in Natural Sciences 2012.

Kovács T., Csöngői V., Ernszt D., Feller D., Pongrácz J.E.: Wnt4 promotes tissue destruction during lung aging via inhibiting PPAR γ expression. Second International Doctoral Workshop in Natural Sciences 2013. ISBN: 978-963-08-7403-8 (First prize winner in oral presentation section)

Poszterek

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

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

Csongei V, Feller D, **Kovacs T**, Bartis D, Helyes Z, Pongrácz JE: Three-dimensional human lung micro-cultures for in vitro studies of COPD. ERS Lung Science Conference 2014 Estoril, Portugal. March 21-23, 2014

Egyéb publikációk

Bartis D, Csongei V, Weich A, Kiss E, Barko S, **Kovacs T**, Avdicevic M, D'Souza VK; Rapp R, Kvell K, Jakab L, Nyitrai M, Molnar TF, Thickett DR, László T, Pongrácz JE (2013): Down regulation of Canonical and Up-Regulation of Non-Canonical Wnt signalling in the carcinogenic process of Squamous Cell Lung Carcinoma. PLoS ONE 8(3):e57393. doi:10.1371/journal.pone.0057393 (IF: 3.730)

Ernszt D, Pap A, **Kovacs T**, Keller Zs, Fejes V.A. Gaál P, Werry JE, Nagy L, Pongracz JE, Kvell K: The missing link of thymic senescence (2014) Submitted to Nature Communications (IF: 10.742)

Egyetemi jegyzet

Miskei Gy, Rapp J, Kiss E, **Kovacs T**, Pongracz JE (2014): Basic and Complex Cell and Tissue Culture Techniques for Biotechnology Students. University of Pécs

Egyéb poszterek

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. 9th János Szentágothai Interdisciplinary Conference and Student Competition, Pécs, Hungary, 3-4 May 2013 ISBN 978-963-642-519-7

Sípos G, Csöngői V, Kovács T, Kvell K, Pongrácz JE: Development of an in vitro 3D lung tissue model containing activated T-cells to study chronic obstructive pulmonary disease (COPD). 9th János Szentágothai Interdisciplinary Conference and Student Competition, Pécs, Hungary, 3-4 May 2013 ISBN 978-963-642-519-7