

A fizikai aktivitás hatása patkány bélgyulladásos modellben

Készítette: Boros Éva

BEVEZETÉS

A szervezetet érő káros behatásokkal szemben az immunrendszer veszi fel a harcot. Az első védelmi vonal a veleszületett immunválasz, mely felismerve a különböző patogén asszociált molekuláris mintázatokat (pathogen-associated molecular pattern; PAMP) valamint a károsodott saját sejtekből származó molekulákat (danger-associated molecular pattern; DAMP) megfelelő válaszreakció indukálására képes, mely gyakran gyulladásban nyilvánul meg.

Az akut gyulladás gyorsan kialakuló és szigorúan szabályozott folyamat, melynek fontos elemei a mintázatfelismerő receptorok, a gyulladást okozó effektor molekulák (citokinek, kemokinek) valamint a negatív regulátor molekulák. A szabályozás bármely szintjén bekövetkező defektus krónikus gyulladásához vezethet.

A gyulladásos bélbetegségek (inflammatory bowel disease; IBD) közül a Crohn-betegség (CD) illetve a colitis ulcerosa esetén a tápcsatorna egy részét vagy egészét érintő krónikus gyulladás jellemző. A betegség súlyos hasi görcsökkal, hasmenéssel és a felszívódás zavaaraival jár. A krónikus, elhúzódó gyulladás a betegek életének minden területére kihatva az életminőség csökkenéséhez vezet [1].

A fizikai aktivitás általános közérzetre és egészségre gyakorolt jótékony hatását számos tanulmány taglalja. A mozgás, többek között hozzájárul a mentális és testi egészség kialakításához és fenntartásához, ezáltal az életminőség javításához. A reumatoid arthritisz (RA), mely szintén krónikus gyulladással járó autoimmun betegség, esetén is a mozgás jótékony hatásáról számolnak be az általános egészségi állapot és a betegség aktivitásának tekintetében [2]. Ezzel szemben a fizikai aktivitás IBD-s betegek állapotára gyakorolt hatásáról kevés tanulmány készült, és ezek is ellentétes eredményről számolnak be [3].

Az autoimmun betegségekre (pl.: RA, CD) általánosan jellemző krónikus gyulladás a veleszületett immunitás azon defektusából ered, mely során már nem képes különbséget tenni a saját és az idegen molekulák és struktúrák között. A saját alkotókat idegenként érzékelve autoimmun választ generál, mely egy önmagát gerjesztő gyulladásos folyamattá alakulhat.

A veleszületett immunrendszer szabályozásában résztvevő receptorok

A gyulladásos folyamatok elindításához szükséges a szervezetet érő káros hatások érzékelése, mely receptorok aktiválódásán keresztül jelátviteli molekulák segítségével kaszkád mechanizmusok beindításához vezet. A molekuláris mintázatok (PAMP, DAMP) felismerése mintázat felismerő receptorokon keresztül valósul meg (pattern-recognition receptor; PRR), amelyek közül a legtöbbet tanulmányozottak a Toll-like receptorok (TLR) és NOD-like receptorok (NLR) [4].

A TLR család tagjai, melyek membránkötött formában fordulnak elő a sejthártyák illetve endoszómák felszínén a különböző mikrobákból (pl.: Gram-negatív baktériumok sejtfalából származó lipopoliszacharid; LPS) vagy a gazda szervezetből (pl.: hő-sokk fehérjék) származó DAMP-okat ismerik fel. A receptorok aktiválódásukat követően gyulladás-keltő és -gátló effektor molekulák, pl. citokinek és kemokinek expresszióját indukálják [5].

Ezzel szemben az NLR család tagjai a citoplazmában helyezkednek el és hatásuk jóval szerteágazóbb. Emberben 22 NLR fehérjét írtak le, pl NOD1, NOD2, NLRP3 és NLRP6. A NOD1 iE-DAP (D-gamma-Glu-mDAP), a NOD2 pedig MDP (muramil dipeptid) felismerésre képes és az NF- κ B-n keresztül szabályozza a gyulladás-keltő és -gátló molekulák kifejeződését. Fontos kiemelni, hogy a NOD2 polimorfizmusait több tanulmány is ok-okozati összefüggésbe hozza a Crohn-betegség kialakulásával [6]. A NLRP3 az inflammaszóma kialakításán keresztül gyulladáskeltő mediátorok termelését serkenti [7]. Az NLRP3-mal ellentétben az NLRP6 negatívan szabályozza a veleszületett immunválaszt, vagyis gátolja a gyulladáskeltő effektor molekulák kifejeződését [8].

A TAM receptor család tagjai a Tyro3, az Axl és a Mertk, valamint ligandjaik a Gas6 és a Protein S (ProS) nélkülözhetetlenek, többek között, az apoptotikus sejtek fagocitózisában és immun-, ideg- valamint reprodukív-rendszer megfelelő működésében. Ezen felül dendritikus sejtekben és makrofágokban a TLR-ek indukálta gyulladásos válasz inhibitorai [9].

A TAM receptorok funkcióját elsősorban knock-out (KO) egereken vizsgálták, melyek az autoimmun betegségekre jellemző tüneteket produkáltak: a perifériás limfoid szervek megnöttek, a lép és a nyirokcsomók sokszorosukra duzzadtak, az ízületek megdagadtak, valamint a vérben megnőtt a keringő antitestek, autoantitestek száma. A TAM jelátvitelben bekövetkező deficienciákat kapcsolatba hozták több autoimmun betegséggel, pl.: reumatoid artritisszel (RA) vagy szisztémás lupus erythematosusszal (SLE) [10].

A veleszületett immunrendszer effektor molekulái

A ligandnak a receptorhoz való kötődésével megtörténik a jelátviteli útvonal aktivációja, mely során a citoplazmatikus transzkripciós faktorok (pl. NF- κ B) a sejtmagba transzlokálódnak. Az NF- κ B jelátviteli út valamint a MAP kináz kaskád gyulladás-keltő és -gátló effektor molekulák termelését indukálják: az expresszálandó citokineknek és kemokineknek fontos szerepe van a gyulladás szabályozásában. Ezek az alacsony molekulahúlyú fehérjék elsősorban a sejtek közötti jelátvitelben vesznek részt és attól függően, hogy a gyulladást milyen irányba befolyásolják, beszélhetünk gyulladás-keltő pl. TNF α (tumor necrosis factor α), IL1 β (interleukin 1 β) és -gátló pl. IL10 (interleukin 10) citokinekről illetve kemokinekről pl. CXCL1 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 1).

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti felállás

Kísérleteink során hím Wistar patkányok (250-300 g) csoportjának felét a hathetes kísérleti periódus alatt futókerékkel ellátott ketrecekben tartottuk, ezáltal bármikor végezhettek rekreatív jellegű fizikai aktivitást. A fizikailag aktív és inaktív csoportok felének vastagbelébe 6 hét elteltével 10 mg TNBS-t (2,4,6-trinitrobenzén szulfonsav 250 µl 50%-os etanolban feloldva), a másik felükbe hordozóanyagot injektáltunk (negatív kontrol), majd három nap múlva az összes állatból citrátos csövekbe vért vettünk, valamint eltávolítottuk a vastagbeleket (1. ábra).

RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív polimeráz lánc reakció (qPCR)

Fizikailag aktív illetve inaktív és kezeletlen vagy TNBS-kezelt hím Wistar patkányok vastagbelét 1 ml TRIzol Reagentsbe (Life Technologies; LT) helyeztük. A mintákat ULTRA-TURRAX T-18 homogenizátor segítségével homogenizáltuk (2x30 másodpercig 5000 rpm-en), majd 1/3-ad mennyiségű kloroformot (Sigma) adtunk a szuszpenziókhoz és erőteljesen vortexeltük. A mintákat ezután 13000 rpm-mel 10 percig centrifugáltuk, végül totál RNS-t izoláltunk RNeasy Plus Mini Kit-tel (Qiagen) a gyártó által javasolt protokoll szerint. Ezzel párhuzamosan az állatokból PBMC-t (peripheral blood mononuclear cells) izoláltunk Ficoll Paque Plus (GE Healthcare) segítségével gradiens centrifugálással. A PBMC-ből az előzőekben leírt módszerrel szintén totál RNS-t izoláltunk. Az izolált RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop (Thermo Scientific) és Bioanalyzer (Agilent) készülékekkel határoztuk meg. Az izolált totál RNS-ből SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit vagy High Capacity RNA to cDNA Kit (mindkettő Life Technologies) segítségével cDNS-t szintetizáltunk a gyártó által javasolt protokoll szerint. Az egyes molekulát kifejeződésének mértékét kvantitatív PCR-rel (qPCR) StepOne Plus Real-Time PCR System (LT) segítségével határoztuk meg. A qPCR reakciókat Power SybrGreen (LT) vagy TaqMan Gene Expression Master Mixeket felhasználásával mértük össze, a megfelelő specifikus primereket alkalmazva (1. táblázat). A fals-pozitív eredményeket, melyek a cDNS genomi DNS szennyeződéséből adódhatnak, exon-exon határokra tervezett primerek alkalmazásával kűszöböltük ki.

Minden mérést két technikai ismétléssel végeztünk és több mint 5 biológiai párhuzamost alkalmaztunk. A vizsgált gének relatív génexpresszióját a 18S rRNS szintjéhez normalizálva $\Delta\Delta C_T$ módszer alkalmazásával számítottuk ki.

SAGE-Seq (Serial analysis of gene expression by next generation sequencing)

A SAGE-Seq kísérletekhez az RNS minták feldolgozását SOLiD SAGE Kit (LT) segítségével végeztük a gyártó által javasolt protokoll szerint, majd SOLiD S4 (LT) újgenerációs szekvenáló készüléken határoztuk meg a szekvenciákat. A protokoll kivonata a 2. ábrán látható.

A SAGE-Seq bioinformatikai kiértékelése

A SOLiD által generált nyers szekvenciákat a SOLiD SAGE Analysis Software v1.10-el térképeztük a patkány referencia mRNS adatbázisra (BIOPROJECT Accession: PRJNA12455ID). A művelet után az egyes génekre térképeződő szekvenciák számából digitális expressziós értéket kapunk. A módszerrel mintán belül illetve normalizálás után minták között is összehasonlíthatóak a génexpressziós szintek.

Beágyazás, immunfluoreszcens festés

A vastagbelek beágyazása Technovit 7100 protokoll alapján történt. A Reichert Jung 1140 Autocut mikrotómmal 7 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket tárgylemezre rögzítettünk. A metszetek köré Dako Pen S2002 segítségével a folyadékok számára átjárhatatlan, vízálló, alkoholban és acetonban oldhatatlan vonalat húztunk. A mintákat 200 µl 0,1% TritonX-et (Sigma) és 5% szérumot (Fetal bovine serum (FBS); LT) tartalmazó PBS-el (egységesen PBT) blokkoltuk 20 percig. A blokkolást követően a mintákat egér anti-Axl (Santa Cruz) ellenanyagot tartalmazó PBT oldattal inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Ezután a metszeteket háromszor 5 percig PBT-vel mostuk, majd 90 percig sötétben inkubáltuk FITC-el konjugált anti-egér IgG (Sigma) másodlagos ellenanyaggal. Háromszor 5 perces PBT-s mosás után, a metszeteket 5 percig inkubáltuk DAPI-t (4',6-diamidino-2-phenylindole) tartalmazó PBT-vel. 5 perces PBT-s mosást követően a metszeteket Citifluorral fedtük, amely megakadályozza a fluoreszcens jel kioltását. Az így elkészített mintákat Zeiss Axio Observer Z1 fluoreszcens mikroszkóppal elemeztük.

Statisztika és ábrázolás

A feltüntetett adatok minden esetben legalább három független biológiai mintán mért értékek és átlagai (függőleges vonal). A statisztikai analízishez SPSS 19 adatfeldolgozó szoftvert használtunk. Az adatok feldolgozása, a szignifikancia megállapítása ANOVA program segítségével történt LSD-, valamint Bonferroni-tesztek alkalmazásával. Az egyes értékek közötti különbséget szignifikánsnak a $p \leq 0,05$ teljesülése esetén tekintettük.

EREDMÉNYEK

Munkánk során TNBS indukált patkány IBD modellben vizsgáltuk a különböző gének expressziós mintázatának változását. Első kísérletsorozatunkban arra voltunk kíváncsiak, hogy a gyulladás helyén mért expressziós változásokat mennyire tükrözik a keringő PBMC-kben mért adatok (3A. ábra). A kezelt illetve kezeletlen állatcsoportokból izolált PBMC-k génexpressziós értékeinek változása alapján azt tapasztaltuk, hogy az inaktív kezeletlen csoporthoz képest, a futó kezeletlen állatok esetén a vizsgált gyulladás-keltő valamint -gátló citokinek/kemokinek (TNF α , IL1 β , CXCL1 illetve IL10) kifejeződése csökken. A TNBS-kezelt fizikailag aktív és inaktív csoportok gyulladáskeltő citokin/kemokin expressziójában számottevő különbséget nem tapasztaltunk, azonban a gyulladás-gátló IL10 alacsonyabban fejeződött ki a rekreatív jellegű mozgást végző patkányoknál (3A. ábra).

A teljes vastagbél szakaszok (3B. ábra) vizsgálata során megállapítottuk, hogy maga a fizikai aktivitás nem okoz szignifikáns változást a vizsgált gének expressziójában. Az általunk vizsgált gyulladás-keltő citokinek/kemokinek közül azonban az IL1 β és a CXCL1 esetében is a génexpresszió szignifikáns emelkedését tapasztaltunk fizikailag inaktív TNBS kezelt állatok vastagbelében; a fizikai aktivitás ezt a markáns emelkedést szignifikánsan csökkentette. Ezen állatcsoportok különbséget mutattak az IL10 expressziójában is, azonban míg a kezelt futó patkányokban az IL1 β és CXCL1 alacsonyabb, addig az IL10 magasabban expresszáldott a TNBS kezelt inaktív patkányok értékeihez képest, ami arra enged következtetni, hogy a gyulladás-keltő mechanizmusokkal párhuzamosan aktiválódik a gyulladás-gátlás is.

A PBMC-ből és a teljes vastagbél szakaszokból származó eredményeinket összevetve megállapítottuk, hogy a keringő PBMC-k esetében mért expressziós adatok nem tükrözik a gyulladás helyén mért adatokat. Például PBMC-ben az IL1 β expressziója TNBS kezelés hatására nem változik a kontrollhoz képest, míg ugyanazon patkányok vastagbelében szignifikáns emelkedést mértünk. Még ellentmondóbb a CXCL1 expressziója, amely TNBS kezelt állatok PBMC-iben szignifikánsan csökken, a vastagbélben pedig megemelkedik. Végül az IL10 expressziója is eltérő képet mutat PBMC-k és a vastagbél esetén. Ezek az eredmények arra következtetnek, hogy a vérből izolált mononukleáris sejtekben mért génexpressziós értékek nem utalnak a szervezetben fennálló gyulladásra, amit a bélben mért génexpressziós adatok egyértelműen igazolnak.

A TNBS kezelés hatására az állatok vastagbelében markáns gyulladás jött létre, mely jól elkülöníthető volt a nem-gyulladt régióktól (1. ábra). A gyulladt/nem-gyulladt területek aránya állatonként változott, ezért annak érdekében, hogy ezen szakaszok génexpressziós értékei ne

titrálják ki egymást, a teljes vastagbél szakaszokat tovább fragmentáltuk gyulladt és nem-gyulladt régiókra és a további vizsgálatainkat már ezeken a mintákon végeztük el.

A SAGE-Seq szekvenálás során minden egyes mintából > 18 millió szekvencia taget generáltunk. A szekvenciák bioinformatikai feldolgozása után a teljes transzkriptómáról, azaz több mint 20000 gén expressziójának változásáról kaptunk képet a TNBS-kezelés által kiváltott gyulladás valamint a fizikai aktivitás tükrében. Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy a SAGE-Seq módszerrel nem a génexpresszió relatív mértékét, hanem az expresszió irányának változását mérjük. A megváltozott expressziójú gének egy része már korábban ismert patkány bélgyulladásos modellben, mint pl. az IL1 β , a TNF α [11] és az IL23 megemelkedett expressziója: ezeket a kísérletsorozatunk pozitív kontrolljának tekinthetjük, hiszen a SAGE-Seq megerősítette a korábban ismert adatokat. Ugyanakkor számtalan olyan gén expressziójában is mértünk változást, amelyeket korábban még nem hoztak összefüggésbe a betegséggel. A továbbiakban ezek egy része kerül bemutatásra, pl. a gyulladásos folyamatokban negatív regulátorként ismert TAM receptor család és ligandjaik valamint az NLR gén-család, illetve az effektor szerepet betöltő citokinek/kemokinek (4., 5. ábra).

Az újgenerációs szekvenálási eljárások (mint pl. SAGE-Seq) előtt a teljes transzkriptómát érintő változások monitorozására elsősorban microarray technológiát alkalmaztak. Az elmúlt 15 év során azonban kiderült, hogy a microarray analízisek során mért génexpressziós változások egyrészt nehezen reprodukálhatók, másrészt független módszerrel vizsgálva (pl. qPCR) gyakran eltérő eredményre derül fény. Annak érdekében, hogy igazoljuk a SAGE-Seq eredményeink megbízhatóságát, 13 gén expresszióját qPCR-el is megvizsgáltuk. Ezek a gének egyrészt a kísérletsorozatunk első fázisában is vizsgált gyulladás-keltő valamint -gátló citokinek/kemokinek (TNF α , IL1 β , CXCL1 illetve IL10) továbbá a TAM receptorok és ligandjaik (Tyro3, Axl, Mertk, Gas6 és ProS), illetve az NLR családba tartozó gének (NOD1, NOD2, NLRP3 és NLRP6). Mivel mindegyik qPCR-ral kapott eredményünk alátámasztja a SAGE-Seq során mért adatokat, ezért utóbbi a teljes transzkriptómára nézve reprezentatívnak tekinthető.

A kemokin receptorok és ligandjaik expressziója (5. ábra) között párhuzam figyelhető meg: ahol a receptor expressziója a kontrollhoz képest megemelkedett, ott többnyire a ligandjánál is ezt tapasztaltuk. Számos gén esetében a fizikai aktivitás szignifikánsan befolyásolta az expresszió mértékét: a) a gyulladt területeken pl. emelkedett CCL3 expressziót mértünk, mely fizikai aktivitás hatására tovább nőtt, b) ezzel szemben a CCL5 kifejeződése a gyulladt területeken lecsökken és futás hatására tovább csökkent; végül c) a CCL21 és CXCL13 expressziója az inaktív állatok gyulladt régióiban fokozódott, mind a kontrollokhoz, mind az aktív patkányok gyulladt területeihez képest. Az egyes proinflammatorikus citokinek (IL1 α , IL1 β , IL11, IL23 α , IL33, TNF α) expressziója jelentősen nőtt a fragmentált vastagbél szakaszok

gyulladt régiókban, mind a kontroll állatok, mind a TNBS kezelt nem-gyulladt területek értékeihez viszonyítva. Meglepő módon az antiinflammatorikus IL10, IL16 és a TGF β három altípusa is a gyulladáskeltő mediátorokhoz hasonlóan megnövekedett expressziót mutatott. A TNF α IP-k (TNF α inducible protein) közül a TNF α IP2 és TNF α IP6 esetében mértünk a gyulladt vastagbél szakaszokban megnövekedett expressziót a TNBS kezelést követően.

A fragmentált vastagbél régiókból származó SAGE-Seq (5. ábra) és qPCR (6. ábra) adatok is azt mutatják, hogy ellenben a teljes vastagbéllal, a TNF α expressziója szignifikánsan nőtt a TNBS-kezelt gyulladt területeken mind a kontroll csoportokhoz, mind a TNBS-kezelt nem-gyulladt régiókhoz képest. Ugyanez mondható el az IL1 β , CXCL1 és IL10 kifejeződéséről is: a gyulladt területeken szignifikánsan nőtt a gének expressziója, azonban a TNBS-kezelt nem-gyulladt régiók nem mutatnak szignifikáns változást a kontroll csoportokhoz képest. Az inaktív és aktív kezeletlen csoportok a vizsgált citokinek tekintetében nem mutatnak szignifikáns eltérést, vagyis a fizikai aktivitásnak nem volt hatása a vizsgált gének expressziójára.

A SAGE-Seq adatok alapján érdekesnek találtuk a TAM receptor család tagjainak illetve ligandjaiknak az expressziós mintázatát (4. ábra). Érdekes módon, amíg a Mertk mindegyik csoportban illetve régióban azonos mértékben expresszáldott, addig az Axl és a Tyro3 kifejeződésében eltérést tapasztaltunk a gyulladt régiókban. Ezen felül, míg az Axl fokozott expresszióját tapasztaltuk a gyulladt területeken, addig a Tyro3 downregulálódott. Ahogy maguk a receptorok úgy ligandjaik expressziója sem mutatott egységes képet: a Gas6 expressziója nem változik fizikai aktivitás vagy TNBS-kezelés hatására, a ProS azonban az Axl-hez hasonló megemelkedett expressziós mintázatot mutat a gyulladt területeken (7. ábra).

Az eddig bemutatott eredmények a transzkripció szintjén lejátszódó változásokat reprezentálják. Mivel azonban számos poszttranszkripciós szabályozó mechanizmust ismerünk, amelyek meggátolhatják, hogy az adott mRNS-ről fehérje íródjon át, ezért kíváncsiak voltunk, hogy az Axl esetében tapasztalt megemelkedett mRNS szint megemelt fehérje szinttel párosul-e. Ennek érdekében immunfluoreszcens festését végeztünk, specifikus anti-Axl ellenanyag felhasználásával. A 8. ábrán jól látszik, hogy csak a gyulladt területeken tapasztalható a megemelkedett Axl fehérje expresszió, ami egybevág az ugyanezen területeken mért megemelkedett génexpresszióval.

Az NLR család tagjai közül a CIITA, a NOD1, a NOD2, a NLRP3 és az NLRP10 expressziója szignifikánsan megemelkedett a gyulladt területeken, ezzel szemben az NLRP6 a kifejeződése a gyulladt területeken csökkent. Érdekes megfigyelés, hogy a Crohn-betegséggel polimorfizmusai miatt már korábban kapcsolatba hozott NOD2 expressziója a gyulladt területeken szignifikánsan nőtt (9. ábra) ami tovább emeli a NOD2 szerepét a betegség kialakításában/fenntartásában.

DISZKUSSZIÓ ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Munkacsoportunk patkányokban 2,4,6-trinitrobenzén-szulfonsav (TNBS) által indukált IBD modellben újgenerációs szekvenálás segítségével transzkriptóma vizsgálatot végzett. Kísérleteink során nem csupán arra voltunk kíváncsiak, hogy a gyulladás folyamán mely gének kifejeződése változik meg, hanem arra is, hogy a rekreatív jellegű mozgásos tevékenység megváltoztatja-e az adott gének expresszióját.

Kvantitatív real-time PCR-rel megerősített eredményeink azt mutatják, hogy amíg a rekreatív jellegű fizikai aktivitás önmagában csökkenti a vérből izolált mononukleáris sejtekben a gyulladásokeltő effektorok kifejeződését, addig ez gyulladás esetén már nem következik be. Megfigyeléseink arra is rámutatnak, hogy a PBMC-k esetén kapott értékek alapján nem detektálható a szervezetben fennálló gyulladás. A bélszakaszokat vizsgálva megállapítottuk, hogy a gyulladt régiókban jelentősen megnövekszik az összes vizsgált gyulladásokeltő effektor molekula expressziója, ezzel szemben a negatív szabályozó molekulák kifejeződése nem mutat egységes képet. Amíg ugyanis az Axl, a ProS, a NOD2 és az NLRP3 expressziója jelentősen megemelkedik, addig a Tyro3 és a NLRP6 kifejeződése lecsökken.

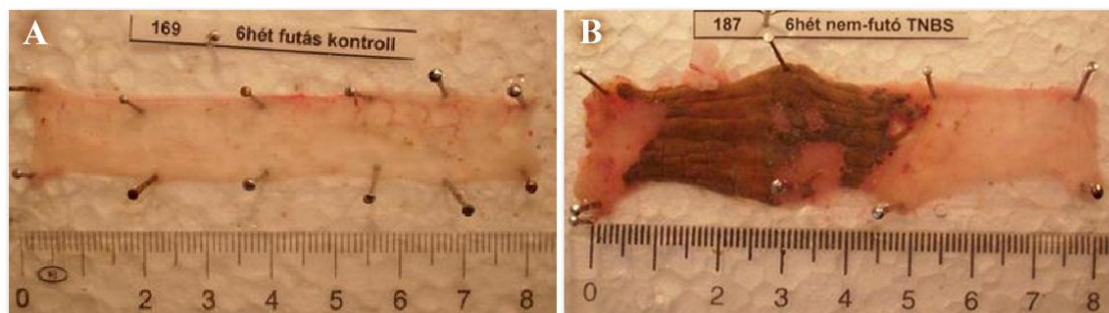
Eddigi megfigyeléseink arra utalnak, hogy a gyulladásos területeken az egyes negatív szabályozó molekulák kifejeződésének csökkenése előidézheti a gyulladásokeltő effektor molekulák folyamatos és magas szintű expresszióját.

IRODALOMJEGYZÉK

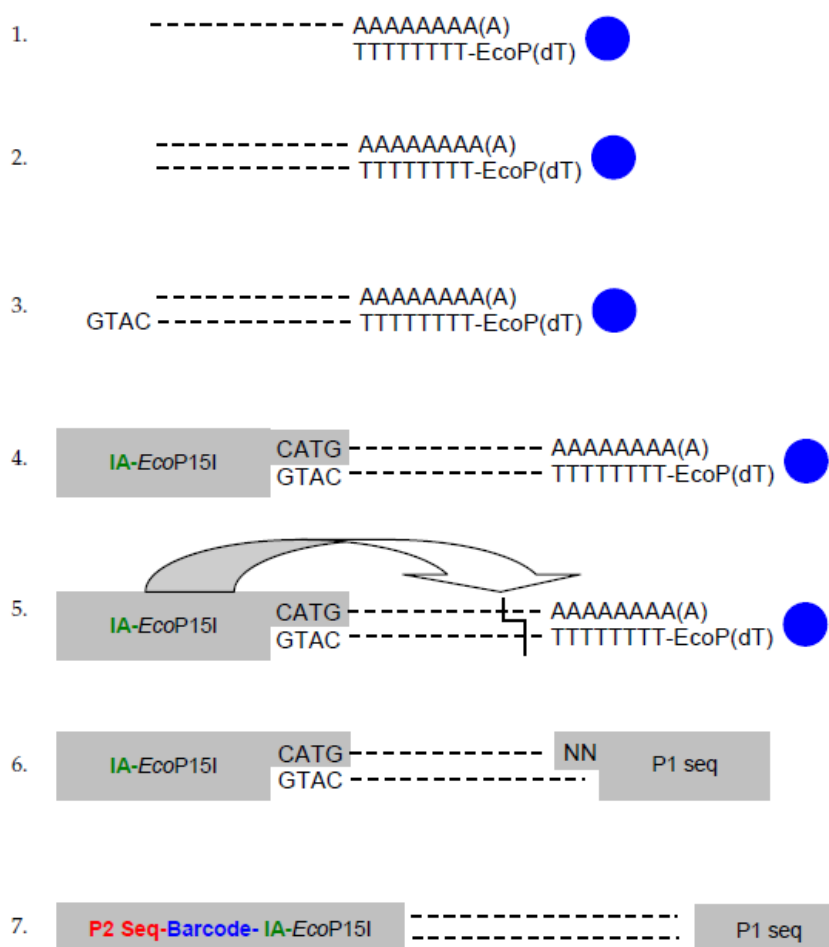
1. Perez, C.A., *Prescription of physical exercise in Crohn's disease*. J Crohns Colitis, 2009. **3**(4): p. 225-31.
2. Ng, V., et al., *Exercise and Crohn's disease: speculations on potential benefits*. Can J Gastroenterol, 2006. **20**(10): p. 657-60.
3. Werkstetter, K.J., et al., *Lean body mass, physical activity and quality of life in paediatric patients with inflammatory bowel disease and in healthy controls*. J Crohns Colitis, 2012. **6**(6): p. 665-73.
4. Hansen, J.D., L.N. Vojtech, and K.J. Laing, *Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins*. Dev Comp Immunol, 2011. **35**(9): p. 886-97.
5. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
6. Elinav, E., et al., *Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 665-79.
7. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
8. Anand, P.K., et al., *NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens*. Nature, 2012. **488**(7411): p. 389-93.
9. Rothlin, C.V., et al., *TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1124-36.
10. Rothlin, C.V. and G. Lemke, *TAM receptor signaling and autoimmune disease*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(6): p. 740-6.
11. Shi, X.Z., J.H. Winston, and S.K. Sarna, *Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(1): p. G41-51.

FÜGGELÉK

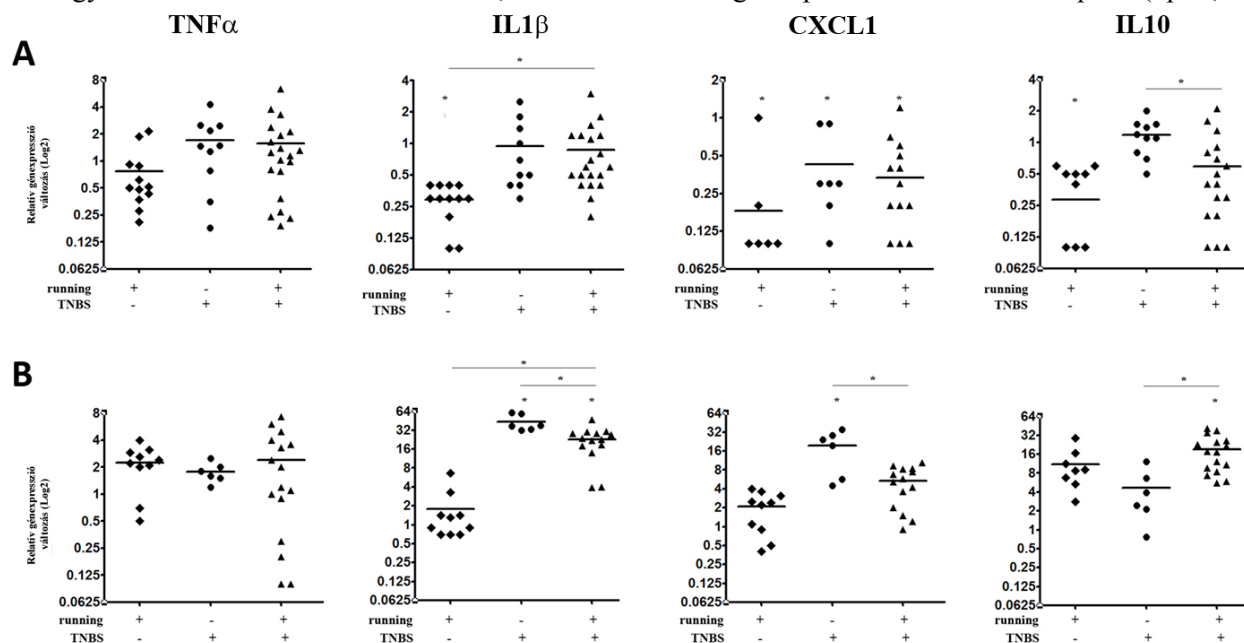
1. ábra Kontroll (A) és TNBS-kezelt (B) patkány vastagbél preparátuma



2. ábra SAGE-Seq eljárás lépései: A tisztított totál RNS-ből a poly(A) RNS-eket Dynabeads Oligo(dT) EcoP mágneses gyöngyökre hibridizáltuk. SuperScript III reverz transzkriptázzal és *E. coli* DNS polimerázzal dupla szálú cDNS-t szintetizáltunk a gyöngyön kihorgonyozott RNS-ekből. A cDNS *Nla* III restrikciós endonukleázzal történő emésztése után GTAC túlnyúló végek jöttek létre, melyre a Barcode adaptor A-t (IA-EcoP15I) ligáltuk, ami egy EcoP15 restrikciós enzim kötőhelyet és egy belső adaptor (IA) szekvenciát tartalmaz. EcoP15 emésztéssel az adaptortól 25-27 bp távolságban downstream irányba 2 bp-os túlnyúló véget létrehozva lehasítottuk a gyöngyökről a konstruktot. A 2bp-os túlnyúló véget felhasználva ezután a P1 szekvenciával rendelkező Adaptor B-t ligáltuk az 5' végre. Mindegyik könyvtárat különböző Barcoded SOLiD 3' primerrel jelöltük, melyek a SOLiD emulziós PCR-hoz szükséges P2 szekvenciát tartalmazták. Az ePCR során a szekvenáló gyöngyök felszínére felamplifikált könyvtárakat szekvenáló lemezre rögzítettük, majd újgenerációs szekvenálási módszerrel (SOLiD V4 System, Life Technologies) megszekvenáltuk, mintánként >18 millió nyers szekvencia taget generálva.



3. ábra A gyulladás-keltő és -gátló citokinek/kemokinek expressziója eltérő képet mutat PBMC és teljes vastagbél szakaszok esetén. $TNF\alpha$, $IL1\beta$, CXCL1, $IL10$ génexpressziójának változása **A.** PBMC (peripheral blood mononuclear cell) és **B.** teljes vastagbél szakaszok esetében rekreatív jelleggel végzett fizikai aktivitás és/vagy TNBS kezelést követően inaktív, kezeletlen állatok génexpressziós értékeihez képest. (* $p<0,05$)



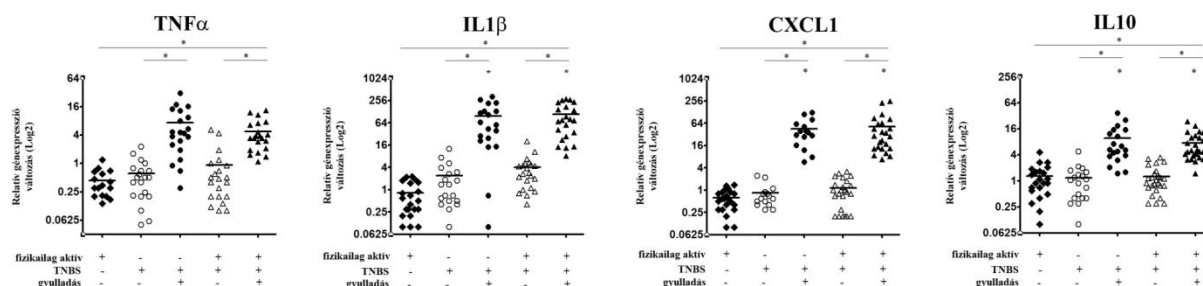
4. ábra A TAM-receptor tirozin kináz család és ligandjaik, valamint az NLR- receptor család génexpressziós változásai fragmentált vastagbél szakaszok gyulladt illetve nem-gyulladt régióiban fizikai aktivitás és/vagy TNBS kezelés hatására. (Színskála: zöld-alacsonyabb, piros-magassabb értékek)

TAM receptor tirozin kináz család és ligandjaik							NLR receptorok						
TYRO3	102	37	66	104	62	95	CIITA	11	6	10	27	10	13
AXL	10	6	11	19	13	31	NOD1	119	204	218	334	178	321
MERTK	4	2	5	1	1	2	NOD2	13	6	13	90	11	172
GAS6	2554	2568	2306	2428	2691	2467	NLRP3	16	13	19	198	6	200
PROS	374	355	518	758	494	639	NLRP6	23	14	60	3	42	7
fizikailag aktív	-	+	-	-	+	+	NLRP10	2	13	4	20	6	5
TNBS	-	-	+	+	+	+	NLRX1	14	9	11	10	10	10
gyulladás	-	-	-	+	-	+	fizikailag aktív	-	+	-	-	+	+
							TNBS	-	-	+	+	+	+
							gyulladás	-	-	-	+	-	+

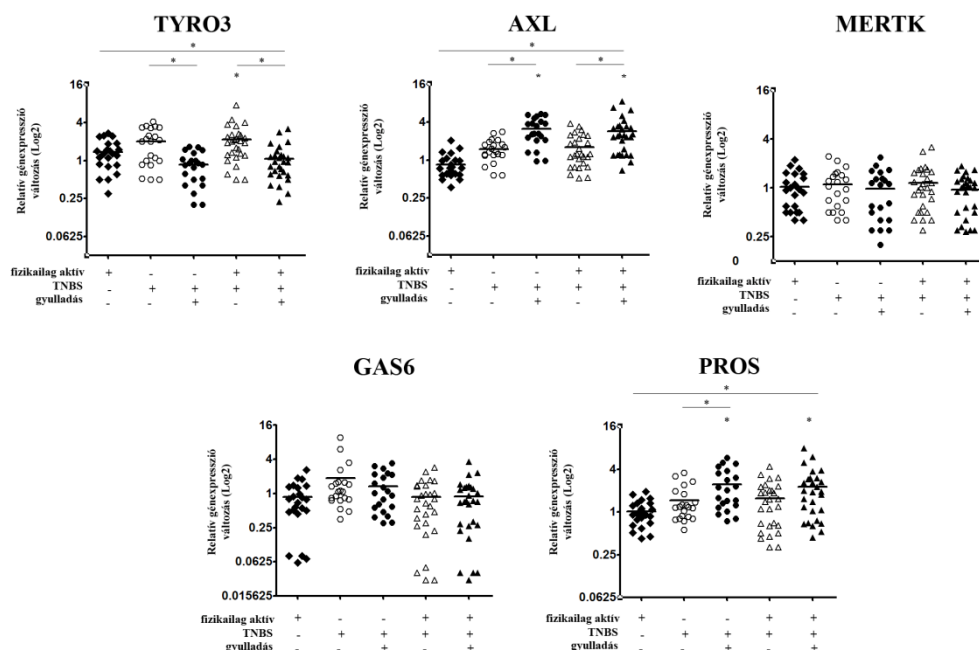
5. ábra A kemokin receptorok és ligandjaik, illetve citokinek génexpressziós mintázatának változása fragmentált vastagbél szakaszok gyulladt illetve nem-gyulladt régióiban fizikai aktivitás és/vagy TNBS kezelés hatására (Színskála: zöld-alacsonyabb, piros-magasabb értékek)

Kemokin receptorok és ligandjaik							Citokinek						
CCR1	45	51	84	640	112	475	IL1α	40	43	25	404	42	544
CCL3	32	25	51	4542	204	8595	IL1β	11	3	2	212	2	300
CCL5	28	22	64	18	28	6	IL7	25	22	29	6	17	16
CCL7	209	143	188	3539	221	4572	IL11	0	1	5	222	7	193
CCR2	3	1	2	16	3	20	IL12α	6	4	11	5	10	8
CCL7	209	143	188	3539	221	4572	IL15	0	1	0	0	1	1
CCL12	58	28	32	247	16	426	IL16	28	129	121	476	80	224
CCR5	16	25	40	115	37	141	IL18	0	4	3	0	1	2
CCL3	32	25	51	4542	204	8595	IL23α	5	2	5	90	8	130
CCL5	28	22	64	18	28	6	IL33	549	481	269	976	233	1197
CCR6	7	33	25	44	11	17	IL34	39	119	168	65	120	81
CCL20	0	12	8	2	26	21	TGFα	88	51	37	31	39	42
CCR7	0	2	1	8	0	1	TGFβ1	33	36	58	221	66	198
CCL21	735	680	1419	2197	747	766	TGFβ2	6	8	4	12	4	14
CCR9	21	15	12	27	16	26	TGFβ3	20	31	36	96	38	108
CCR10	10	4	9	7	2	7	TNFα	1	2	3	23	2	21
CCL28	67	140	68	9	77	17	TNFαIP1	801	828	968	887	800	916
CXCL1	5	13	6	596	19	491	TNFαIP2	90	177	192	796	162	891
CXCR3	8	7	22	5	12	11	TNFαIP6	67	43	27	424	62	640
CXCL9	4	1	21	11	13	7	TNFαIP8	481	647	596	1065	793	1082
CXCL10	9	4	14	2	1	3	fizikailag aktív	-	+	-	-	+	+
CXCR4	12	42	41	248	49	180	TNBS	-	-	+	+	+	+
CXCL12	111	116	279	1216	247	805	gyulladás	-	-	-	+	-	+
CXCR5	0	2	1	5	0	1							
CXCL13	144	418	505	1575	649	669							
CXCR7	500	584	556	479	318	571							
fizikailag aktív	-	+	-	-	+	+							
TNBS	-	-	+	+	+	+							
gyulladás	-	-	-	+	-	+							

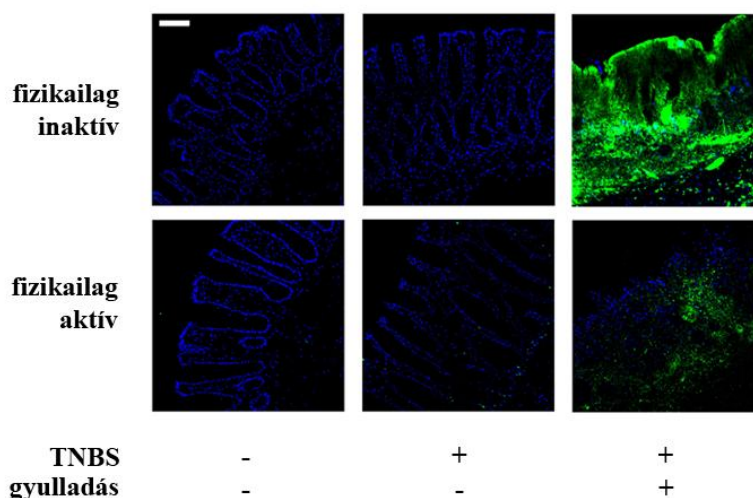
6. ábra A qPCR validálás megerősítette a SAGE-Seq eredményeit. TNF α , IL1 β , CXCL1 és IL10 génexpressziós mintázatának változása fragmentált vastagbél szakaszok esetében rekreatív jelleggel végzett fizikai aktivitás és TNBS kezelést követően inaktív kezeletlen állatok értékeihez viszonyítva. (*p<0,05)



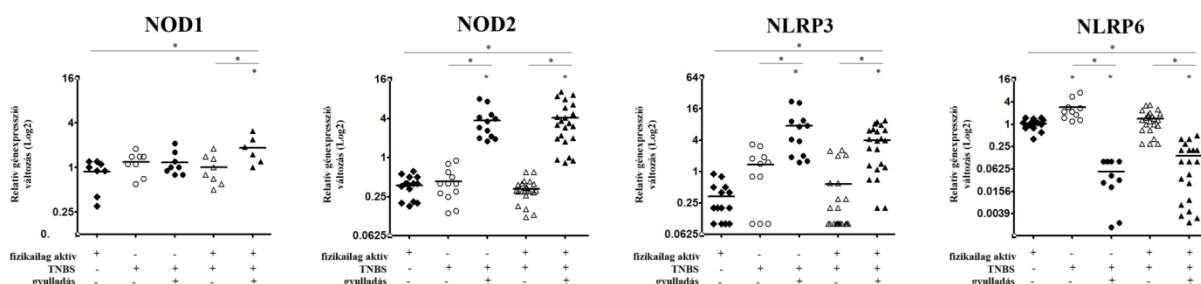
7. ábra A TAM receptorokat és ligandjaikat eltérő expressziós mintázat jellemzi. Az Axl, Tyro3, Mertk, Gas6 és a ProS génkifejeződésének változása fragmentált vastagbél szakaszok esetében rekreatív jelleggel végzett fizikai aktivitás és TNBS kezelést követően inaktív kezeletlen állatok génexpressziós értékeihez képest. (*p<0,05)



8. ábra Az Axl fehérje kifejeződésének immunfluoreszcens vizsgálata. (kék - DAPI: sejtmag, zöld - FITC: Axl; skála: 100 µm)



9. ábra Az NLR gén-család tagjai eltérő expressziós mintázatot mutatnak TNBS indukálta bélgyulladásban. Amíg a NOD 2 és az NLRP3 expressziója a gyulladt területeken szignifikánsan megemelkedik, addig az NLRP6 kifejeződése lecsökken. NOD1, NOD2, NLRP3 és NLRP6 génkifejeződésének változása fragmentált vastagbél szakaszok esetében fizikai aktivitás és/vagy TNBS kezelés után inaktív kezeletlen állatok értékeihez viszonyítva. (*p<0,05)



1. táblázat Specifikus primer párok és assay-ek, amelyeket a SybrGreen (A) illetve a TaqMan alapú (B) qPCR reakciókban használtunk.

A		Forward primer (5' → 3')	Revers primer (5' → 3')
TNFα		GCTCCCTCTCATCAGTTCCA	GGCTTGTCACCTCGAGTTTTGA
IL1β		CAGGAAGGCAGTGTCACTCA	AGACAGCACGAGGCATTTTT
CXCL1		CATTAATATTTAACGATGTGGATGCGTTTCA	GCCTACCATCTTTAAACTGCACAAT
IL10		CCTGCTCCTACTGGCTGGAG	TTGTTCACTGGTCTCTTCTT
NOD1		GCTCATCCGGACCAAACTA	CTGCCCAGGTTTTCATTGTT
NOD2		TCCTTGACACACAAGCAGAAC	TGATCAGCCACAACCTTCAGC
NLRP3		GCTGCTCAGCTCTGACCTCT	AGGTGAGGCTGCAGTTGTCT
NLRP6		TACCTGGTCATTGTGCTCCA	TCAGAGGCTGAGGATGTGTG
B			
Tyro3		Rn00567281_m1	
Axl		Rn01457771_m1	
Mertk		Rn00576094_m1	
Gas6		Rn00588984_m1	
ProS		Rn01527321_m1	
18S		Hs99999901	