

**Lép vaszkulátúra fejlődési átprogramozottsága és a B-1a sejtek
homeosztázisa Nkx2.3 homoedomén tanszkripciós factor deficiens
egérmodellben**

PhD téziszfüzet



Dr. Lábadi Árpád

PTE, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Témavezető: Dr. Balogh Péter

2014.

Bevezetés

Az immunrendszer fejlődése, funkciója és homeosztázisa a mezenhimális és hemopoetikus sejtjeinek szoros együttműködésén alapul. A nyirokszövetek mezenhimális sejtjeinek prekursorokból történő fejlődését mobilis hemopoetikus sejtek irányítják. A nyirokszövetek aztán az adaptív immunválaszhoz, és a hemopoetikus sejtek homeosztázisához biztosítanak megfelelő környezetet.

Ismert, hogy a lép nélkülözhetetlen szerepet tölt be egy speciális sejtcsoport, a B-1a sejtek homeosztázisában és működésében. Ugyanakkor ezen homeosztatikusság kapcsolat számos aspektusa még ismeretlen. Egérmodellekben végzett vizsgálatok alapján felmerült a B-1a sejtek patogenetikai szerepe számos autoimmun, és malignus hematológiai kórképben. Ezért fontos, és indokolt lehet a lép B-1a sejtek homeosztázisában betöltött szerepének vizsgálata fiziológiás és patológiai körülmények között.

A lép a legnagyobb szoliter, másodlagos nyirokszövet, melynek fő szerepe a vérbe kerülő patogénekkal szembeni védelem. Szövettani struktúrája igen jellegzetes. A lép limfoid komponense, a fehér pulpa a lépartéria terminális ágai, a centrális arteriálák köré rendeződik. Ennek központi részei az arteriála körüli limfatikus hüvely (PALS), vagyis a T-sejt zóna, illetve a folliculusok, azaz a B-sejt zóna. Ezt a központi részt veszi körül a marginális zóna (MZ), mely a fehér- és vörös pulpa határán helyezkedik el. A MZ és a központi fehér pulpa között található a marginális szinusz (MS), mely feltételezések szerint a keringő limfociták lépbe történő kilépési kapuja. A vörös pulpa szinuszoid rendszere több, különféle, jellegzetes elrendeződést mutató endotel sejtcsoportból épül fel. A fehér és a vörös pulpa szöveti vázát fibroblasztok alkotják. Ezek, hasonlóan az endotel sejtekhez heterogének, eloszlásuk szintén területi jellegzetességet mutat.

A lép a dorzális mezogasztrium mezenhimális sejtjeiből fejlődik. Fejlődéséhez számos transzkripciós faktor és receptor-ligand kölcsönhatás szükséges. A receptor-ligand kölcsönhatások közvetítik azoknak celluláris kapcsolatoknak a hatását, melyek a lép prekursorsejtjei és a keringő hemopoetikus sejtek között jön létre a lép fejlődésének különböző szakaszaiban. Számos transzkripciós faktor játszik szerepet a lép korai fejlődésében, és ezen faktorok bármelyikének hiánya aszpléniát eredményez. Ezzel szemben a később megjelenő transzkripciós faktoroknak a hiánya a lép egyes régióinak fejlődési rendellenességét eredményezheti. Bizonyított, hogy az Nkx2.3 transzkripciós faktor hiánya a lép összetett strukturális változását vonja maga után. Legjellegzetesebbek ezek közül a MS és a MZ hiánya, a PALS és a folliculusok elkülönülésének hiánya, a fehér- és vörös pulpa fibroretikuláris állományának, valamint a vörös pulpa szinuszoid rendszerének fejlődési zavara. Az Nkx2.3 KO mutáns egerek tehát modellként szolgálhatnak a lép egyes régióinak immunológiai folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatára.

Fejlődésük és funkciójuk alapján az immunrendszer sejtjei két csoportba oszthatók: (1) azok, melyek először válaszolnak a patogénekre, alkotják a veleszületett, (2) míg azok, melyek az antigén specifikus immunválasz és az immunológiai memória kialakításában szerepelnek, alkotják az adaptív immunrendszert. A két rendszer nem különül el élesen, és a nemrég jellemzett „innate-like” limfociták (ILL sejtek) szintén a két rendszer határán helyezkednek el jellegzetességeik alapján. Ezek a sejtek az adaptív immunrendszer sejtjeihez hasonlóan klonálisan átrendezett antigénreceptort expresszálnak. Azonban a receptorjaik molekuláris tulajdonságai, azok alacsony diverzitása, illetve a sejtek preaktivált, válaszra kész állapota ezeket a sejteket a veleszületett immunrendszer sejtjeihez teszik hasonlóvá. Az ILL sejtek egyik csoportját a B-1a sejtek képezik.

A B-1a sejtek speciális limfociták. Egerekben elsősorban a szerózális üregekben és a lépben található, valamint CD5-öt expresszálnak, mely egyedülálló tulajdonság az egér B-sejt csoportok között. Jellegzetességük továbbá, hogy nagy részük az embrionális korban

képződik az embrionális májban elhelyezkedő prekurzorokból. Az embrionális képződésüket követően önfenntartó osztódás biztosítja a sejtpopuláció fennmaradását. A felnőtt csontvelő is képes B-1a sejt termelésre, de fiziológias körülmények között az csontvelői B-1a sejt termelés elhanyagolhatóan kismértékű, így a sejtek fennmaradását szinte kizárólag az önfenntartó osztódás biztosítja steady-state állapotban. A B-1a sejtek fennmaradásához a lép nélkülözhetetlen. Valószínűleg a recirkuláló, B-1a sejteknek túlélési / osztódási szingált biztosít, ám ennek a szignálnak a természete még nem ismert. Hasonlóan más B sejtekhez, a B-1a sejtek immunglobulin génátrendeződésen esnek át az érésük során, és ezt követően B-sejt receptort (BCR) expresszálnak. Továbbá, minden előzetes antigén expozíció nélkül ellenanyagot is termelnek. Ezek az ellenanyagok az úgynevezett természetes antitestek. A természetes antitestek polyreaktívak, számos antigénhez képesek kis affinitással kötődni, közöttük saját antigénekhez is. Hasonlóan a B-1a sejtek önfenntartó osztódásához, a természetes antitestek termelése – irodalmi adatok szerint – szintén lép-függő folyamat.

Célkitűzések

Bár ismert az, hogy a lép nélkülözhetetlen a B-1a sejtek fenntartásához, nem ismert pontosan, hogy a lép mely kompartmentje, illetve sejtjei vesz részt ebben a homeosztatis folyamatban. Ezért a különféle lép fejlődési rendellenességgel bíró egerek értékes modellek lehetnek a B-1a sejtek homeosztatis fenntartásához szükséges szöveti környezeti struktúrák és szignálok jellemzéséhez. Ezért az Nkx2.3 KO egerek lép vaszkulaturáját vizsgáltam, ezt követően pedig az B-1a sejtek homeosztázisának vizsgálatával foglalkoztam ebben az egérmodellben.

- (1) A MS hiánya, a nyirokcsomószerű limfoid összetétel az Nkx2.3 KO mutáns lépben, valamint korábbi mikroarray vizsgálatok eredményei miatt kezdetben annak a vaszkuláris struktúra azonosításával foglalkoztam, mely a mutáns lép limfocita homingért felelős.
 - A magas endotelű venula (HEV) marker génjeinek expresszióját vizsgáltam vad típusú és mutáns egerek lépében, perifériás és mezenterialis nyirokcsomóiban.
 - A mutáns lép HEV-szerű érkepleteinek morfológiai jellemzését végeztem.
 - Vizsgáltam továbbá ezen HEV-szerű érkepletek funkciójának relevanciáját a limfociták mutáns lépbe történő homingjával kapcsolatban.
- (2) Vad típusú egérben B-1a sejtek homeosztatis szöveti megoszlását vizsgáltam fiziológias körülmények között és lipopoliszacharid (LPS) kezelést követően. A vizsgálatok elvégzéséhez egy új carboxifluorescein diacetát szukcidimidil észter (CFSE) alapú intraperitoneális *in situ* jelölési módszert dolgoztam ki.
- (3) A B-1a sejtek homeosztázisának és funkcióinak korfüggő változását vizsgáltam Nkx2.3 KO mutáns egérben
 - Áramlási citometria és több sejtfelszíni jelölést biztosító antitest segítségével igazoltam, hogy a mutáns egerek CD5⁺ B sejtjei a vad típusú B-1a sejteknek megfelelő sejtpopulációt reprezentálnak.
 - A B-1a sejtek gyakoriságának és a természetes antitestek titerének korfüggő változását vizsgáltam Nkx2.3 KO mutáns és vad típusú egerekben.
 - Adoptív B-1a sejt transzferrel vizsgáltam az Nkx2.3 KO mutáns stromális környezet szerepét a B-1a sejtek mutáció következtében létrejövő homeosztatis eltéréseiben.

Anyagok és Módszerek

Egerek

129Sv x B6 kevert alapú Nkx2.3 KO mutáns egereket 14 generációnak megfelelően BALB/c alapon tenyésztettünk. A homozigóta KO mutánsok azonosítása konvencionális PCR technikával történt. Adoptív sejtranszfer kísérlethez donorként BALB/c egereket használtunk. Az egerek felhasználása a PTE vonatkozó etikai szabályai szerint történt.

In situ CFSE jelölés

CFSE-t Ca^{++} és Mg^{++} mentes PBS-ben oldottuk, majd intraperitoneálisan oltottuk vad típusú vagy mutáns egerben. Az oltás után meghatározott időpontokban a CFSE pozitív sejtek százalékos arányát vizsgáltuk a peritoneumban, pleurában és a különféle perifériás nyirokszövetekben.

Intraperitoneális LPS oltás.

LPS-t Ca^{++} és Mg^{++} mentes PBS-ben oldottuk és 100 ug/ml koncentrációjú oldatot oltottunk intraperitoneálisan 2 órával a CFSE oltást követően.

Sejtszuspenzió készítés

A nyirokszövetek izolálása után a szöveti struktúrát tárgylemezek között roncsoltuk, az izolátumot 70 um-es sejt szűrőn szűrtük át. Peritoneális sejteket szubszternális, pleurális sejteket pedig parasternális metszést követően öblítéssel nyertünk.

Áramlási citometria

A sejtszuspenzió jelölése jelöletlen, vagy biotinált primer, majd ennek megfelelően fluoreszcein konjugált Ig-specifikus szekunder antitesttel, vagy streptavidin-fikoeritrinnel történt. A méréseket BD FACSCalibur citométerrel végeztük, az adatok elemzése WindMDI 2.8 software-el történt.

Immunhisztokémia és immunofluoreszcencia

Konvencionális jelölési eljárásokat követően a képeket Olypmus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal nyertük, a képek elemzéséhez anlySIS programot használtunk.

Nyirokcsomókból izolált limfociták in vitro CFSE jelölése és a jelölt sejtek adoptív transzfere

Perifériás (pLN) és mezenterialis (mLN) nyirokcsomókból izolált limfocitákat *in vitro* vagy CFSE-vel vagy szulfo-N-hidroxizukcinimid biotin észterrel jelöltünk. Homing vizsgálatok céljából a sejtszuspenziót (5×10^7 sejt / recipiens) a recipiens állatok farokvénáin keresztül intravénásan (i.v) oltottuk be 200 ul-es térfogatban. Az oltás után meghatározott időintervallumokat követően a recipiens állatok lépét izoláltuk. A sejtek megoszlását immunofluoreszcencia révén anti-PNAd, IBL-11 (fehér pulpa fibroblaszt specifikus) antitestekkel, illetve – előhívás céljából – PE-jelölt anti-patkány IgG ellenanyagokkal vizsgáltuk. Kompetitív homing vizsgálatához a fenti kétféle *in vitro* sejtjelölési módszert

alkalmaztuk, ezt követően a CFSE jelölt sejteket tisztított MEL-14 IgG, vagy izotípus-kontrollként szolgáló IBL-10 antitestekkel inkubáltuk. Mosást követően a sejteket 1:1 arányban a referenciaként szolgáló biotinált sejtekkel kevertük össze, majd a sejtkeveréket i.v. oltottuk recipiens állatokba. 30 perccel az oltást követően a recipiens állatok lépében és nyirokcsomóiban áramlási citometriával vizsgáltuk a CFSE és biotin jelölt sejtek arányát. Az áramlási citométeres vizsgálat előtt a nyirokszervekből izolált biotinált, donor eredetű limfocitákat streptavidin-biotin használatával tettük láthatóvá. A különféle szövetekből izolált sejtek CFSE:biotin arányát az injekciózás előtti donor sejtkeverék CFSE:biotin arányával normalizáltuk úgy, hogy a szövetekből izolált sejtek CFSE:biotin arányát az oltás előtti sejtkeverék CFSE:biotin arányával osztottuk.

Peritoneális sejtek in vitro CFSE jelölése és peritoneális sejtranszfer

Peritoneális sejteket a peritoneális üreg kimosásával nyertük. Jelölés céljából 10^6 /ml koncentrációjú izolált sejtszuszpenziót inkubáltunk 1 ug/ml, vagy 6 ug/ml koncentrációjú, PBS/0.1% BSA-ban oldott CFSE oldattal 37°C-on 10 percig a sejtek folyamatos forgatása közben. A CFSE optimális koncentrációját előkísérletek révén határoztuk meg. A jelölési reakció leállítása céljából a sejteket jéghideg komplet DMEM médiummal mostuk. 5×10^6 CFSE jelölt sejtet oltottunk intraperitoneálisan (i.p.) a recipiens állatokba.

ELISA

ELISA lemezeket 23 ug/ml Pneumovax-23-mal, 10 ug/ml foszforilkolinnal (PC), vagy 5 ug/ml monoklonális patkány anti-egér IgM (IBL-16) ellenanyaggal érzékenyítettünk a pneumokokus poliszacharid (PPS)-, a PC-specifikus, valamint az össz szérum IgM és IgG relatív szérumkoncentrációjának meghatározása céljából Nkx2.3 KO mutáns és vad típusú állatokban. A lemezekre az állatok megfelelő mértékben hígított szérumát pipettáztuk. A reakciókat tormaperoxidáz konjugált nyúl anti-egér IgM és IgG segítségével ortofeniléndiamin szubsztrát használatával hívtuk elő. A kísérletet 490 nm-en végzett abszorbanciaméréssel értékeltük.

Kvantitatív RT-PCR

Különféle nyirokszövetekből történő totál RNS izolálás és annak DNase emésztése után reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk. qPCR-t egerenként hat párhuzamos mintában futtattunk Sybre Green festék alkalmazásával ABI 7500 real time PCR készüléken. A kapott értékeket β -aktinra normalizáltuk. Valamennyi gén esetében a szövetekből izolált cDNS-t használtuk a standard görbék előállításához. A normalizált adatokat a különféle szövetek vad típusú léphez, mint referenciához viszonyított relatív génexpressziós értékeinek meghatározására használtuk.

Statisztikai analízis

Az adataink normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. Az adatok páronkénti összehasonlítását kétmintás t-próbával végeztük, ahol ez a vizsgálat megfelelő volt. Többszörös adatok elemzéséhez ANOVA és Bonferroni poszt-analízist végeztünk. 0.05-nél kisebb p értéket tekintettünk valamennyi esetben statisztikailag szignifikáns eltérésnek. A elemzéseket SPSS 14.0-es programmal végeztük.

Eredmények

Az Nkx2.3 KO mutáns egér lépének vaszkuláris átprogramozottsága

Az Nkx2.3 KO mutáns egér lépének limfoid sejtés összetétele a nyirokcsomókéhoz hasonló

Annak ellenére, hogy az Nkx2.3 KO mutáns lépből hiányoznak azok a lép-struktúrák, melyek a limfocita homingot mediálják, jelentős limfoid akkumuláció figyelhető meg ebben a szervben. Ez arra utal, hogy egyéb, ezt a funkciót betöltő struktúráknak jelen kell lenniük. Annak érdekében, hogy a mutáns lép pontos limfoid összetételét meghatározzam, áramlási citometriát alkalmaztam. A mutáns lép limfoid összetétele az emelkedett T limfocita arány alapján a nyirokcsomók, nem pedig a vad típusú lép limfoid összetételéhez volt hasonló. Továbbá, ugyancsak a nyirokcsomók limfoid sejtjeihez hasonlóan, a mutáns lépben levő limfociták emelkedett L-szelektin expressziót mutattak.

A magas endotelű venulákkal (HEV) kapcsolatos marker gének megváltozott expressziója a lépben és a nyirokcsomókban.

A mutáns lép súlyos szerkezeti eltérései, valamint a nyirokcsomó szerű limfoid akkumuláció indokolta tette annak vizsgálatát, hogy mely molekulák / folyamatok lehetnek felelősek ezen limfoid sejtek szelektív akkumulációjáért. Emellett korábbi microarray vizsgálatok is arra utaltak, hogy a mutáns lépben számos olyan génnek az expressziója megváltozik, melyek a HEV-mediálta szövetspecifikus hominggal kapcsolatosak. Vizsgálataink során realtime PCR vizsgálatot végeztünk, hogy ezen gének expresszióját vizsgáljuk vad típusú és mutáns lépben, pLN-ben és mLN-ben. Ezek a gének vagy PNA core-fehérjéket (MAdCAM-1, GlyCAM-1, CD34, endomucin, nepmucin, podocalyxin-szerű protein), vagy az azokat glikoziláló, fukoziláló, vagy szulfatáló modifikációs enzimeket kódolják (glikoziltranszferázok: B3gnt3 and Gcnt1; fukoziltranszferáz: Fut7; szulfotranszferáz: Chst2 and Chst4). A mutáns lép legmarkánsabb génexpressziós változása a GlyCAM-1 túlexpressziója és a MAdCAM-1 alulexpressziója volt a vad típusú léphez képest. Emellett az összes többi gén mutáns lépben megfigyelhető expressziós mintázata a nyirokcsomókéhoz volt hasonló.

Ektópiás HEV-szerű képletek megjelenése a mutáns lépben

A mutáns lép pLN szerű génexpressziós mintázata, valamint a fehérpulpában és a MZ-ban korábban leírt változások miatt indokolt volt a lép vaszkulaturájának részletes vizsgálata az anti-PNA specifikus MECA-79, és anti-MAdCAM-1 monoklonális antitestekkel. Ellentétben a vad típusú léppel, melyben nincs HEV, fiatal mutáns lépben ezek a PNA pozitív érkepletek prominensen jelen voltak. A nyirokcsomók HEV-jéhez hasonlóan ezek az erek Chst4 szulfotranszferázt is expresszáltak. MECA-79 antitest intravénás adásával és fluoreszcens képalkotással azt is igazoltuk, hogy a PNA az ektópiás HEV-ek luminális, tehát a keringő limfociták számára hozzáférhető felületén helyezkedik el.

A mutáns lép ektópiás HEV-szerű képletei L-szelektin függő módon limfocita homingot mediálnak, és CCL21 kemokint expresszálnak.

Annak céljából, hogy igazoljuk azt, hogy az Nkx2.3 KO mutáns lép ektópiás HEV-szerű képletei limfocita kilépési kapuként szolgálnak, *in vitro* CFSE jelölt limfocitákat oltottunk intravénásan (i.v) mutáns és vad típusú recipiensekbe, és fluoreszcens

mikroszkóppal vizsgáltuk ezeknek az állatoknak a lépét és a nyirokcsomóját. Oltást követően a limfociták a mutáns lépben hasonló felhalmozódási kinetikát mutattak mint a vad típusú vagy akár a mutáns nyirokcsomókban, melynek során a jelölt limfociták a mutáns lép HEV-szerű képleteivel, valamint a nyirokcsomók HEV-jeivel hasonló mértékben asszociálódtak.

A perifériás nyirokcsomókban a limfociták HEV-hez kapcsolódása L-szelektin függő folyamat. Annak bizonyítása érdekében, hogy a PNA^d HEV-ek a mutáns lépben szintén L-szelektin függő homingot biztosítanak, rövid távú kompetitív homing kísérletet végeztem. Azonos számú CFSE-jelölt, MEL-14 (anti-L-szelektin) blokkolt valamint biotinált és mock-kezelt kontroll limfocitákat oltottam intravénásan vad típusú és mutáns recipiens egerekbe. Korábbi irodalmi adatok szerint a MEL-14 antitest meggátolja a limfociták pLN-be irányuló homingját anélkül, hogy eliminálná ezeket a sejteket. Harminc perccel az oltást követően sejteket izoláltam az állatok lépéből és nyirokcsomójából, és áramlási citometriás vizsgálatot végeztem. Eredményeim alapján a CFSE jelölt sejtek mutáns lépbe történő homingja – szemben a vad típusú lépben irányuló hominggal – jelentősen gátolt volt, melyet a CFSE:biotin arány jelentős csökkenése jelzett a mutáns lépben. A mutáns lép CFSE:biotin arányának csökkenése hasonló mértékű volt a vad típusú és a mutáns pLN-ben tapasztalt CFSE:biotin arány csökkenéséhez, mely arra utal, hogy a mutáns lép ektópiás HEV-je L-szelektin függő módon biztosítja a limfociták homingját.

A limfociták HEV-en történő megállását a PNA^d és az L-szelektin között kapcsolat biztosítja. Ezt követően a limfociták endotelen történő átvándorlása CCL21 kemokin mediálta folyamat, melyen szintén a pLN HEV-je expresszál. Az ektópiás HEV-ek CCL21 expresszióját kettős immunfluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk MECA-79 és anti-CCL21 antitesteket alkalmazva. Míg a vad típusú lépben a CCL21 jelölés a PALS fibroretikuláris hálózatára korlátozódott, addig a mutáns lépben a PNA^d-del mutatott kolokalizációt, a nyirokcsomókban látottakhoz hasonlóan.

In situ CFSE jelölés a peritoneális és az extraperitoneális B-1 sejtek kölcsönök, kinetikus kicserélődését igazolja

A mutáns lép vaszkuláris eltéréseinek vizsgálatát követően az volt a célom, hogy a B-1a sejtek homeosztázisát vizsgáljam ezekben az állatokban. Azonban a B-1a sejtek steady-state homeosztatikusan folyamatainak számos aspektusa még vad típusú egerekben is ismeretlen. Ennek főleg az az oka, hogy az erre irányuló eddigi vizsgálatok alapját B-1a sejtek adoptív átvitele jelentette, mely önmagában megváltoztathatja ennek a sejtcsoportnak a homeosztatikusan viselkedését. A célom az volt tehát, hogy egy fluoreszcens intraperitoneális *in situ* jelölési technikát dolgozzak ki a B-1a sejtek homeosztázisának sejtbevétel nélküli vizsgálatára. Ezzel a technikával a peritoneális B-1a sejtek homeosztatikusan tulajdonságait vizsgáltam steady-state állapotban, és LPS stimulálást követően.

A peritoneális fehérvérsejtek hatékony és szelektív in vivo jelölése

A CFSE egy sokoldalú, sejtek jelölésére szolgáló fluoreszcens ágens. A sejtekbe való diffúzióját követően az intracelluláris térben felhalmozódik, anélkül, hogy hatással lenne a sejtek működésére. A CFSE a sejtek stabil *in vitro* és *in vivo* jelölésére egyaránt alkalmas. Ennek megfelelően azt tapasztaltam, hogy optimális koncentrációjú és térfogatú CFSE oldat egyetlen alkalommal történő intraperitoneális oltása az ott levő limfoid és mieloid sejtek többségének jelölését eredményezi. Az oltást követő CFSE jelölés a peritoneális térre korlátozódott, és nem terjedt ki a lép, vér, nyirokcsomók vagy a pleura hemopoetikus sejtjeire.

Az *in vitro* jelölt sejtek peritoneális adoptív transzferéhez képest ez az *in situ* jelölési technika a peritoneális limfociták reprezentatívabb jelölését biztosította. A jelölés könnyen reprodukálható, és többszöri ismétlés során is konzisztensnek találtam.

Intraperitoneális CFSE oltással a peritoneális limfocita alcsoportok eltérő kicserélődési kinetikáját jellemeztük steady-state állapotban

Az intraperitoneális jelölési technikát felhasználva azt vizsgáltam, hogy az egyes peritoneális limfoid alcsoportok az extraperitoneális térben levő limfocitákkal történő, eltérő kicserélődési kinetikával bírnak-e. Ennek céljából a peritoneális CFSE⁺ limfociták százalékos arányának időbeli változását vizsgáltam az egyes limfoid alcsoportokon (B-1, B-2 and T) belül áramlási citometriával. A vizsgálatot az *in situ* CFSE jelölést követő 6 órától 4 hétig folytattuk. A peritoneális limfociták közül a T sejtek bírnak a leggyorsabb kicserélődési kinetikával. Hat órával a jelölést követően a sejteknek 50%-a CFSE⁺, 50%-os kicserélődési kinetikára utalva ez alatt az idő alatt. 1 héttel a jelölést követően a CFSE⁺ T sejtek aránya 2-5% volt, és a vizsgálati időszakunk alatt stabil maradt ezen az értéken. A B sejtek esetében a kicserélődés jelentősen lassabb folyamat volt, és sebessége összefüggést mutatott a B-1/B-2 fenotípussal. A jelölést követő vizsgálat a B-2 sejtek 2 nap alatt, a B-1 sejtek két hét alatt bekövetkező 50%-os kicserélődési arányát igazolta. A B-1 sejteken belül nem találtunk jelentős különbséget a B-1a és a B-1b sejtek kicserélődési kinetikájában a vizsgálat időtartama alatt. A CFSE⁺ B-1 sejtek aránya 2 héttel a jelölést követően 45-50%-on stabilizálódott, és a vizsgálat ideje alatt ezt követően nem változott számottevően. Ezzel szemben a CFSE⁺ B-2 sejtek aránya 4 hét alatt folyamatosan csökkent a 4 hét alatt. Ezek az adatok tehát arra utalnak, hogy steady-state állapotban a peritoneális limfociták közül a T sejtek kicserélődési kinetikája a leggyorsabb. A B-2 sejtek lassabban cserélődnek ki. B-1 sejtek maradnak a legtovább a peritoneális üregbe, extraperitoneális (CFSE⁻) B-1 sejtekkel való kicserélődésük a leglassabb, és rövid időn belül egyensúlyi állapotot ér el az extraperitoneális kompartmentekkel való kicserélődésük.

A peritoneális B-1 sejtek LPS indukálta osztódása és peritoneális térből való fokozott kilépése a sejtek preferenciális pleurális homingjával jár együtt

Korábbi *in vitro* és *in vivo* adatok utalnak arra, hogy a B-1 sejtek toll-like receptor 4-en (TLR-4, LPS receptor) keresztül történő stimulálása a B-1 sejtek gyors osztódását, és a peritoneális térből való fokozott kilépését eredményezi. Emiatt azt vizsgáltam, hogy milyen hatással van egy egyszeri, a CFSE jelölést követően két órával adott intraperitoneális LPS oltás a B sejtek viselkedésére. Az LPS az oltást követő 24 órán belül mind a B-2, mind a B-1 sejtek fokozott emigrációját eredményezte, melyre a B-2 sejtek abszolút számának 50%-os, a B-1 sejtek számának pedig 40%-os csökkenése utalt. Egy héttel a stimulálást követően a B-2 és a B-1 sejtek száma is rendeződött. A sejtszám rendeződését részben a B sejtek fokozott osztódása, részben az extraperitoneális térből történő fokozott beáramlás eredményezte. A fokozott sejtosztódás mértéke a CFSE^{dim}, a fokozott sejt bevándorlás mértéke pedig a CFSE⁻ populációk kvantifikálásán keresztül volt mérhető.

A peritoneális üreg mellett a B-1 sejtek a pleurában is megtalálhatók, de a két kompartmentben elhelyezkedő B-1 sejtek viszonya ismeretlen. Emiatt azt vizsgáltam, hogy intraperitoneális CFSE jelölést követően megjelennek-e jelölt B-1 sejtek a pleurában, és azt is, hogy ez a folyamat hogyan befolyásolható intraperitoneális LPS stimulálással. Azt tapasztaltam, hogy a jelölést követően mind a CFSE⁺ B-1, mind a CFSE⁺ B-2 sejtek aránya növekszik a pleurában. A B-1 sejtek pleurális akkumulációját az LPS 3x-osan gyorsította, míg a B-2 sejtek esetében az LPS stimulálás nem volt hatással. Ezek az adatok arra utalnak, hogy

mind a peritoneális B-1, mind a B-2 sejtek preferenciálisan transzlokálódnak a pleurába, de ezt a folyamatot csak a B-1 sejtek esetében segíti az LPS stimulálás.

A B-1a sejtek homeosztázisa Nkx2.3 KO egerekben

A munkám harmadik részében a peritoneális B-1a sejtek homeosztázisát vizsgáltam Nkx2.3 KO mutáns egerekben. A lép B-1a sejtek homeosztázisában betöltött funkcióját vizsgáló eddigi kísérletek vagy aszplenikus egérmodelleken, vagy szplenektómián alapultak. A mi munkánk az első olyan munka, mely a B-1a sejtek homeosztázisát olyan egérmodellben vizsgálja részletesen, mely jól jellemzett lép szöveti eltéréssel bír.

Nkx2.3 KO mutáns és vad típusú BALB/c egérben azonos fenotípusú B-1a sejtek képződnek

Jól ismert, hogy a lép fontos szerepet tölt be a naiv B sejtek érésének utolsó fázisban, melynek során a B limfociták számos fenotípusos változáson esnek át. Ismert az is, hogy bizonyos körülmények között CD5 expresszió indukálható a B limfocitákon. Ezért fontos arról meggyőződni, hogy az Nkx2.3 KO mutáns egér peritoneális CD5⁺ sejtjei valóban B-1a sejtek, nem pedig megváltozott fenotípusú B-2 sejtek, melyek a mutáns lép szerkezetváltozásának még nem ismert hatásaként CD5-öt expresszálnak. Éppen ezért áramlási citometria és sejtfelszíni marker specifikus antitestpanel (anti-IgM, anti-IgD, anti-CD43, anti-CD23 and anti-CD21, anti-MAC-1) használatával vizsgáltam az Nkx2.3 KO mutáns egerek peritoneális CD5⁺ sejtjeinek celluláris identitását. Eredményeim azt mutatják, hogy a mutáns egér egyes peritoneális B-sejt alcsoportjai (B-1a, B-1b, B-2) a vad típusú egér megfelelő peritoneális B-sejt alcsoportjaival egyezik meg a sejtfelszíni marker expressziós mintázat alapján.

Nkx2.3 KO mutáns egerekben a peritoneális CD5⁺ sejtek aránya korfüggő progresszív csökkenést mutat

Az Nkx2.3 transzkripciós faktor peritoneális CD5⁺ sejtek homeosztázisában betöltött szerepének vizsgálata céljából különböző korú mutáns állatok peritoneális sejtösszetételét vizsgáltam áramlási citometriával, és azt azonos korú vad típusú állat sejtösszetételével hasonlítottam össze. Eredményeim szerint a mutáns állatokban a peritoneális CD5⁺ sejtek aránya korfüggő módon csökken. Kezdetben (2 hónapos korig) a B-1c sejtek arányának csökkenése volt kifejezettebb, melyet a B-1a sejtek arányának fokozott csökkenése követett 2 és 4 hónapos kor között. Eredményeim konzisztensek azokkal a korábbi irodalmi adatokkal, melyek szerint a lépnek (feltehetően a vörös pulpa révén) alapvető szerepe van a B-1a sejtek önfenntartó osztódásában. Emellett a peritoneálisához hasonló, korfüggő változás volt megfigyelhető a mutáns állatok pleurális limfoid sejtjeinek arányában is.

Különböző specifitású természetes antitestek szérumkoncentrációjának progresszív csökkenése Nkx2.3 KO mutáns egerekben

A B-1a sejtek termelik az úgynevezett természetes antitesteket, melyek korai, veleszületett-szerű immunválaszt biztosítanak a baktériumokkal és a vírusokkal szemben. A B-1a sejtek nem termelnek ellenanyagot a peritoneális térben, ellenanyag-termelésükhöz szükséges környezetet a lép biztosítja.

Ezért azt vizsgáltam, hogy az Nkx2.3 KO mutáns egérben tapasztalt B-1a sejtekkel kapcsolatos homeosztatikussá válások befolyásolják-e a természetes ellenanyag-termelést ezekben az egerekben. Ennek céljából 1, 2 és 4 hónapos vad típusú és mutáns egér szérum

össz IgM, IgG, PPS-specifikus IgM és PC-specifikus IgM szintjét mértem ELISA technikával. Eredményeim szerint a szérumban az IgM szintje jelentősen alacsonyabb volt 1 hónapos mutánsban, mint a vad típusú egérben. Ellentétben az össz szérumban az IgM szinttel, a PPS és a PC specifikus IgM ellenanyagok szintje később, főleg 1 és 2 hónapos kor között csökkent. Az össz szérumban az IgG szint ezzel szemben egyik életkorban sem mutatott jelentős eltérést a vad típusú és a mutáns állatok között.

Összefoglalásképpen, a PPS- és a PC-specifikus természetes antitestekkel kapcsolatos eredmények alapján a B-1a sejtek antitesttermelése nem függ teljes mértékben az intakt szerkezetű lép jelenlététől, hanem a peritoneális CD5⁺ sejtek korfüggő csökkenésével mutat párhuzamot a mutáns egérben, mely – hasonlóan a PPS- és a PC-specifikus természetes antitestek szérumszintjének a csökkenésével - az 1 és 2 hónap között a legkifejezettebb.

Nkx2.3 KO mutáns egér hatékony B-1a sejt termelésre képes

Korábbi, a B-1a sejtek homeosztázisával foglalkozó tanulmányok szerint a lépnek nem csak a B-1a sejtek posztnatális fenntartásában, de embrionális képzésében is alapvető szerepe van. Eredményeim szerint azonban 1 hónapos KO mutáns egérben is jelentős számú peritoneális B-1a sejt található. Emiatt a főtális B-1a sejt képzésének hatékonyságát vizsgáltam Nkx2.3 KO mutáns egerekben. Ennek céljából 15 napos vad típusú és KO mutáns egerek peritoneális sejtösszetételét vizsgáltam áramlási citometriával. Azt tapasztaltam, hogy a sejtek többsége a CD5⁺ B sejteket reprezentáló CD5^{dim} B220^{dim} populációhoz tartozott mutáns és vad típusú egerekben is. Ennek a sejtnek az aránya azonos volt a két egértörzsben a genetikai háttértől függetlenül. Ezek az eredmények hatékony pre/perinatális, a vad típusútól megkülönböztethetetlen CD5⁺ B sejt képzésre utalnak a mutáns egerekben.

A CD5⁺ B sejtek csökkent osztódása lehet felelős a sejtek KO mutáns egerekben tapasztalt korfüggő csökkenéséért, és ennek oka az Nkx2.3 KO mutáns egerek stromális eltérései

Eddigi eredményeim alapján elmondható, hogy a CD5⁺ B sejtek számának mutáns egerekben megfigyelhető korfüggő csökkenése a hatékony embrionális képzést követő fokozott posztnatális veszteség következménye. Az azonban nem ismert, hogy ez a B sejtek mutáció következtében kialakult intrinsic defektusából adódik, vagy pedig a lép stromális változásának következménye. Az sem ismert, hogy csökkent sejtosztódás vagy fokozott sejtpusztulás eredményezi a CD5⁺ sejtek arányának korfüggő csökkenését.

Ezeknek a kérdéseknek a vizsgálata céljából adoptív sejt transzfer kísérletet végeztem. Vad típusú BALB/c donor egerekből peritoneális sejteket mostam ki, melyeket *in vitro* CFSE jelölést követően Nkx2.3 KO mutáns, vagy vad típusú recipiensekbe oltottam intraperitoneálisan. Két héttel a sejttranszfer után peritoneális sejteket izoláltam a recipiensekből. A B-1a sejt populáción belül a CFSE⁺ sejtek arányát, valamint ezen sejtek CFSE intenzitását áramlási citométerrel vizsgáltam.

Mutáns egerekben a CFSE⁺ donor eredetű CD5⁺ B limfociták alacsonyabb arányát tapasztaltam. Továbbá, a CFSE intenzitás csökkenésének mértéke alapján Nkx2.3 KO mutáns egerekben a B-1a sejtek kisebb mértékben osztódnak, mint a vad típusú állatokban.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy Nkx2.3 KO mutáns egerekben a CD5⁺ sejtek progresszív posztnatális vesztesége – legalábbis részben – a CD5⁺ sejtek csökkent önfenntartó osztódásával kapcsolatos, mely az Nkx2.3 hiánya kapcsán kialakuló stromális változások következménye lehet.

Diszkusszió

A limfoid szövetek fejlődésében számos transzkripciós faktor vesz részt hierarchikusan rendezett és szövetspecifikus módon, ide értve az Nkx homeodomén transzkripciós faktor fehérjecsaldát számos tagját is. Az Nkx2.3 HD transzkripciós faktor lép vaszkulátúra fejlődésében betöltött szerepének vizsgálata céljából BALB/c genetikai háttérre visszakeresztett Nkx2.3 KO mutáns egerek vaszkuláris változásait vizsgáltam. Korábbi tanulmányok súlyos fokú, a vöröspulpát érintő vaszkuláris eltéréseket, a MS és a MZ hiányát, a fehér pulpa T/B zóna szegregációjának zavarát írták le ebben az egérmódelben. A lép kompartmentjei közül a vörös pulpa érintettsége volt a legmarkánsabb. Azok a molekuláris mechanizmusok, melyek a lép szöveti struktúráinak ilyen széleskörű érintettségét eredményezik a mutáns egerekben még nem ismertek. A lépben az Nkx2.3 transzkripciós faktor a főtális korban expresszálódik, éppen akkor, amikor a vörös pulpa kifejlődik. Ez okozhatja azt, hogy az Nkx2.3 hiánya a vörös pulpa fejlődését érinti a legsúlyosabban. BALB/c genetikai háttérű egerekben a mutáció a vörös pulpa teljes hiányát is eredményezheti („redless” lép). Ebből arra is következtethetünk, hogy a fehér pulpa érintettsége a vörös pulpa érintettségének indirekt következménye. Azonban B6 genetikai alapú KO mutáns egerekben a vörös pulpa egy része megtartott, és ennek ellenére is érintett a fehér pulpa fejlődése. Emiatt tehát a fehér pulpa érintettsége valószínűleg nem kizárólag csak a vörös pulpa érintettségének indirekt következménye.

Munkámban igazoltam, hogy az Nkx2.3 KO mutáns egér lépben HEV-szerű vaszkuláris képletek jelennek meg. Ezek az ektópiás képletek pLN HEV-jeivel strukturálisan és funkcionálisan is ekvivalensek. Az Nkx2.3 egyetlen ma ismert célgénje a *madcam-1*. Nem valószínű azonban, hogy a MAdCAM-1 (és a MS) hiánya önmagában eredményezné a limfociták számára lépbeli kilépési kapuként szogáló ektópiás HEV megjelenését. Génexpressziós vizsgálataim arra utalnak, hogy a lépben az Nkx2.3 a pLN fejlődési program gátlójaként működik, így hiánya pLN irányú fejlődési átprogramozottsággal jár. Ezt a feltételezést azonban még további vizsgálatokkal is alá kell támasztani a későbbiekben.

Hogy a peritoneális és extraperitoneálisan elhelyezkedő B-1a sejtek közötti kapcsolatot, illetve a peritoneális B-1a sejtek kicserélődési kinetikáját jellemezhessem, egy új, intraperitoneális *in situ* jelölés technikát dolgoztam ki. Ez a módszer rugalmas, könnyen kivitelezhető, és kevesebb állatot igényel, mint a korábban hasonló célokra kifejlesztett vizsgálatok. Emellett lehetővé teszi azt, hogy a B-1a sejtek viselkedését steady-state körülmények között eddig nem elérhető időintervallumban (a jelölést követő 6 órától legalább 4 hétig) vizsgálhassuk.

A módszer sokoldalúsága miatt hasznos lehet minden olyan későbbi vizsgálatban, mely a B-1a sejtek homeosztázisával és szerózális akkumulációjával foglalkozik. A B-1a sejtek preferenciális szerózális felhalmozódásának oka máig nem ismert. Egyes feltételezések szerint ez a fajta szekvesztrálódás fontos az autoreaktív B sejtek ellenanyag-termelés szabályozásának szempontjából, megakadályozva ezzel, hogy a B-1a sejtek patológiás autoantitest termelő sejtekké alakuljanak. Más elméletek szerint a B-1a sejtek a folyamatos szerózális recirkulációjuk révén biztosítanak egy természetes, jellegzetes B-sejt receptor (BCR) repertoárral jellemezhető védelmi vonalat a szerózális területek számára. Mindkét elmélet további vizsgálatokat, és kísérleti eredményekkel való alátámasztást igényel.

A B-1a sejtek nagy része az embrionális korban képződik, és az eddigi vizsgálatok szerint a főtális képzésükben elengedhetetlen szerepe van a lépnek. Tudomásom szerint a munkám az első olyan vizsgálat, mely a B-1a sejtek főtális képzésének hatékonyságát egy jól jellemzett lépstruktúra-érintettséggel bíró egérmódelben vizsgálja, és abban hatékony főtális

B-1a sejt képzést írt le. Továbbá, eredményeim szerint, a hatékony prenatális B-1a sejt képzést progresszív posztnatális vesztés követi ezekben az egerekben.

Nemrég megjelent vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a felnőtt csontvelő szintén képes B-1a sejtek termelésére. A felnőtt csontvelőből származó B-1a sejtek BCR-jének molekuláris sajátosságai jelentősen eltérnek az embrionálisan képzett B-1a sejtektől. Steady-state állapotban egyébként a csontvelői B-1a sejt képzés minimális, de B-1a sejt depléciót követően számottevővé válhat. Az Nkx2.3 KO mutáns egerekben a B-1a sejtek korfüggő csökkenése arra utalhat, hogy ezekben az egerekben a felnőttkori B-1a sejt képzés nem képes lépést tartani a főtális B-1a sejtek elvesztésével. Ez alapján feltételezhető, hogy a főtális és a felnőtt B-1a sejt képzés léptől való függése szintén eltér egymástól.

Az eredmények rövid összefoglalása

Az Nkx2.3 KO mutáns egerek endoteliális átprogramozottsága ektópás HEV-szerű érképletek megjelenését eredményezi. Ezeket az ereket tipikus magas endotelsejtek bélelik, melyek a PNAd mellett a PNAd egyik modifikációs enzimjét, a Chst4-et, valamint egy, a limfocita transzmigrációhoz szükséges kemokint, a CCL21-et is expresszálják. Ezek a HEV-szerű érképletek a limfociták L-szelektin függő homingját is mediálják. Összefoglalva tehát, a mutáns lép ezen ektópiás képletei strukturálisan és funkcionálisan is ekvivalensek a pLN HEV-jével.

A peritoneális B-1 sejtek vad típusú és mutáns egérben való megoszlásának vizsgálata céljából egy új *in situ* intraperitoneális fluoreszcens jelölési technikát dolgoztam ki. Ezt használva a peritoneális limfoid alcsoportok (B-1, B-2 and T lymphocytes) kicserélődési kinetikáját vizsgáltam egy korábban még nem vizsgált időintervallumban (a jelölést követő 6 órától 4 hétig), és igazoltam azt, hogy a peritoneális és pleurális B-1 sejt pool között kölcsönös kicserélődési viszony van, melynek kinetikája LPS stimuláció hatására fokozható.

Igazoltam azt, hogy a főtális B-1a sejt képzés nem függ az Nkx2.3 HD transzkripció faktor jelenlététől. Ugyanakkor egy progresszív posztnatális peritoneális B-1a sejt csökkenés figyelhető meg Nkx2.3 KO mutáns egerekben. Ez – legalább is részben – a B-1a sejtek csökkent öfenntartó osztódásának a következménye, melynek oka az Nkx2.3 KO mutáns egerek stromális változásai. A B-1a sejtek progresszív csökkenése a természetes antitestek szérumszintjének progresszív csökkenésével jár együtt.

A tézis alapjául szolgáló közlemények

Első szerzős közlemény

Lábadi A, Balogh P. Differential preferences in serosal homing and distribution of peritoneal B-cell subsets revealed by in situ CFSE labeling. *Int. Immunol.* 2009; 21:1047–56.DOI: 10.1093/intimm/dxp071.

IF: 3,403

Társ szerzős közlemény

Czömpöly T, Lábadi A, Kellermayer Z, Olasz K, Arnold H-H, Balogh P. Transcription factor Nkx2.3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen. *J. Immunol.* 2011; 186:6981–9.DOI: 10.4049/jimmunol.1003770.

IF: 5,788 (ebből 2,894 IF-t használtam a disszertációhoz)

A tézishez nem kapcsolódó közlemények

Megosztott első szerzős közlemény

Kellermayer Z, Lábadi A, Czömpöly T, Arnold H-H, Balogh P. Absence of Nkx2.3 homeodomain transcription factor induces the formation of LYVE-1-positive endothelial cysts without lymphatic commitment in the spleen. *J. Histochem. Cytochem.* 2011; 59:690–700.DOI: 10.1369/0022155411410061.

IF: 2,725

Társ szerzős közlemény

Czömpöly T, Lábadi A, Balázs M, Németh P, Balogh P. Use of cyclic peptide phage display library for the identification of a CD45RC epitope expressed on murine B cells and their precursors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 307:791–6.

IF: 2,836

Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O'Hara E, Butcher E.C., Berta G, Balogh A, Arnold HH and Balogh P. Absence of Nkx2-3 homeodomain transcription factor reprograms the endothelial addressin preference for lymphocyte homing in Peyer's patches. *J.Immunol.* 2014; *under publication*

Total IF: 14.752

Könyvfejezet:

Developmental Biology of Peripheral Lymphoid Organs, 2011 Springer
Editor: Dr. Péter Balogh
Chapter 11.: Structural Evolution of the Spleen in Man and Mouse
Péter Balogh and Árpád Lábadi