

AZ NKX2-3 TRANSZKRIPCIÓS FAKTOR SZEREPE AZ EGÉR VISZCERÁLIS
NYIROKSZÖVETEK ÉRFEJLŐDÉSÉNEK SZABÁLYOZÁSÁBAN

Doktori (PhD) tézis

Kellermayer Zoltán

Témavezető: Dr. Balogh Péter
Doktori iskola vezetője: Dr. Lénárd László
PhD program vezetője: Dr. Németh Péter

Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet



Pécs, 2015

I. Bevezetés

I.1. A másodlagos nyirokszervek

Az immunrendszer szerepe a patogének és ártalmatlan struktúrák felismerése és egymástól való elkülönítése, függetlenül azok eredetétől (saját vagy idegen). Ezt a károsodott saját struktúrák és ártalmas mikrobák eltávolítása, valamint a jóindulatú, szimbiotikus antigének tolerálása követi. A másodlagos nyirokszövetek megfelelő környezetet biztosítanak a limfocitáknak az antigénekkal való találkozásra. Egy kulcsfontosságú lépés ebben a folyamatban a limfociták és az antigént szállító antigénprezentáló sejtek bejutása ezekbe a szervekbe és a szerveken belüli migráció. A másodlagos nyirokszövetek közé soroljuk a lépet, a perifériás nyirokcsomókat (pLN), a mukóza-asszociált nyirokszöveteket (MALT, mely magába foglalja a mezenterialis nyirokcsomókat [mLN] és a Peyer plakkokat [PP]), valamint a bőr-asszociált nyirokszöveteket (SALT).

A különböző másodlagos nyirokszervek fejlődése két fő útvonalat követ. A nyirokcsomók kialakulása a hemopoetikus eredetű, limfotoxin alfa béta₂-t (LTαβ₂⁺) expresszáló nyirokszövet indukáló sejtek (LTi) és a strómális eredetű, limfotoxin beta receptort hordozó (LTβR⁺) nyirokszövet organizáló (LTo) sejtek kölcsönhatásán alapszik [van de Pavert és Mebius, 2010]. Ez az interakció a limfoid sejtek bevándorlását eredményezi és elengedhetetlen a normál nyirokcsomó struktúra fenntartásához. A Peyer plakkok ontogenezisében ezenkívül egy további sejtféle, a nyirokszövet iniciáló sejt (LTin) is részt vesz [Hashi és tsai, 2001]. Ezzel szemben a lép fejlődéséhez különböző transzkripciós faktorok egymást követő aktivációja és kölcsönhatása szükséges. A limfotoxin ligandok a szerkezeti kompartmentalizációban fontosak, viszont a lép mint különálló szerv meglétéhez nem szükségesek [Brendolan és tsai 2007].

Felnőtt egér nyirokcsomóiban a B-sejtek a kortexben található folliculusokban helyezkednek el, míg a T-sejtek a folliculusok közötti interfolliculáris zónában vannak [Crivellato és tsai, 2004]. Ezt a kompartmentalizációt a megfelelő homeosztatisz kemokinek differenciált expressziója biztosítja. A limfociták a magas endotelű venulákon (HEV) keresztül lépnek ki a nyirokcsomókba és Peyer plakkokba. A PP-okban hasonló módon a B-sejtek a folliculusokban, míg a T-sejtek a valamivel kisebb interfolliculáris területeken helyezkednek el. A PP epiteliális felszínén úgynevezett M-sejtek találhatók, melyek a lumenális patogének felismerését és felvételét könnyítik meg a különböző immunsejtek számára [Corr és tsai, 2008]. Mindezzel szemben lépben a T-sejtek a centrális arteriolát körülvevő periarteriális limfoid hüvelybe (PALS) lokalizálódnak, míg a B-sejtek ugyanúgy folliculusokban találhatók. A fehér pulpa T-sejtes zónájában jelen lévő retikuláris fibroblasztok (FRC) fontos szerepet játszanak a molekuláris transzportban vezetékrendszer (*conduit*) kialakításában [Nolte és tsai, 2003]. A marginális zóna (MZ) a fehér pulpát körülölelő vékony gyűrű, ami elválasztja a vörös pulpától [Mebius és tsai, 2004]. Ebben két fő makrofág altípus és a marginális zóna B sejtek foglalnak helyet. A lépben nincs HEV, a limfociták a marginális zóna felől érik el a fehér pulpát.

I.2. Perifériás nyirokszövetekben történő limfocita recirkuláció

Emberben és egérben limfociták és egyéb fehérvérsejtek specializált magas endotelű venulákon lépnek ki és jutnak be a másodlagos nyirokszövetekbe. Ez alól

egyedül a lép kivétel, amely ugyanakkor a szervezetben a legnagyobb mértékű össz-limfocita keringést tartja fenn. A szervspecifikus homingot a különböző szervekben eltérő HEV addresszin profil befolyásolja. Így perifériás nyirokcsomó HEV-eken a fő addresszin a MECA-79 monoklonális antitesttel azonosítható “peripheral node addressin” (PNAd), amit a limfocita felszínén lévő L-selectin/CD62L ismer fel [Streeter és *tsai* 1988]. A PNAd epitóp több vázfehérjéből állhat, melyek különböző poszttranszlációs módosulásokon esnek át. Ezzel szemben a nyálkahártyák erein expresszálódó fő addresszin a MECA-367 antitesttel azonosítható “mucosal addressin cell adhesion molecule” (MAdCAM-1), amit a leukociták felszínén lévő $\alpha 4\beta 7$ integrin ismer fel [Berlin és *tsai*, 1993]. Fontos, hogy a non-limfoid lamina propria erek fenotípusa is MAdCAM-1⁺. Érdekes módon újszülött egerekben az összes HEV MAdCAM-1⁺ és pLN-ben csak az első hónap végére veszi át a helyét a PNAd [Mebius és *tsai* 1996].

Az addresszinek mellett a HEV-ek kemokin profilja “finomhangolja” a limfocita altípusok bejutását a különböző területekre. A pLN és PP HEV-eken megtalálható CCL21 kemokin a T-sejtek felszínén lévő CCR7-et ismeri fel és így T-sejtek vándorlását irányítja. A CXCL13 kemokin a B-sejteknek a folliculusokba való bejutását segíti a B-sejten expresszálódó CXCR5 megkötésén keresztül [Warnock és *tsai*, 2000].

Ugyan a HEV fejlődésének és fenntartásának pontos részletei nem ismertek, számos adat utal a különböző limfotoxin ligandok fontosságára. A HEV-ek felszínén LT β R expresszálódik, amely gátlása mind a PNAd⁺, mind a MAdCAM-1⁺ HEV dedifferenciációjához és funkciójának elvesztéséhez vezet [Browning és *tsai*, 2005]. Ezzel ellentétben a fokozott LT β R-aktiváció ektópiás PNAd megjelenését idézi elő [Drayton és *tsai* 2003].

I.3. Nkx2-3 transzkripció faktor

Az Nkx2-3 (Nk2 transcription factor related, locus 3) homeodóment tartalmazó transzkripció faktor a lép és a PP ontogenezisének fontos regulátoraként azonosították, míg pLN kialakulásában nem játszik szerepet. Egérben az Nkx2-3 célzott hiánya a vékonybélben okoz morfológiai elváltozásokat, többek között károsodott villus-fejlődést embrionális korban [Pabst és *tsai*, 1999]. Ezenkívül az Nkx2-3^{-/-} egerek jelentősen kisebb méretű és szabálytalan szerkezetű léppel rendelkeznek. A normál lépre jellemző T- és B-sejt elkülönülés és a marginális zóna is hiányzik. Nkx2-3^{-/-} egerekben kevesebb és kisebb Peyer plakkok találhatóak. Az endoteliális MAdCAM-1 hiányzik, aminek hátterében az Nkx2-3 MAdCAM-1 transzkripciót aktiváló hatásának elmaradása állhat [Pabst és *tsai*, 2000; Wang és *tsai*, 2000]. A B-sejt fejlődés és a T-dependens immunválasz is érintett [Tarlinton és *tsai*, 2003]. Munkacsoportunk korábban az Nkx2-3^{-/-} egerek lépének károsodott érszerkezetét és strómális szerkezetét vizsgálta [Balogh és *tsai*, 2007; Bovári és *tsai*, 2007].

Emberben a közelmúltban a gyulladással járó bélbetegségek (IBD) két fő típusában, Crohn-betegségben és colitis ulcerosa-ban érintett betegekből származó mintákon végzett genomális vizsgálatok polimorfizmust mutattak ki az Nkx2-3 kódoló régiójában [Cho 2008; WTCCC 2007]. Crohn-betegek B-sejtjeiben és gyulladt bélterületeiben jelentősen emelkedett az Nkx2-3 mRNS szintje, míg hasonló eltérés colitis ulcerosa páciensek esetében nem volt kimutatható [Yu és *tsai*, 2012].

II. Célok

Célunk az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktornak az endotél sejtek és érstruktúrák kialakulásában és fenntartásában játszott szerepének vizsgálata volt. Munkánkban az Nkx2-3 két fő előfordulási helyét, a lépét és a beleket vizsgáltuk.

PhD munkám első része a lép vizsgálatára fókuszál. Előzőleg a munkacsoportunk már részletesen vizsgálta az Nkx2-3^{-/-} egerek érszerkezetét. Többek között a vörös pulpa károsodását és ektópiás, PNAd⁺ HEV-ek jelenlétét írtuk le. Most a következő kérdésekre kerestük a választ:

- A fenti endotél-differenciálódási zavarok és egyéb stromális eltérések mellett kimutathatók-e egyéb szerkezeti defektusok Nkx2-3^{-/-} egerek lépében?
- Milyen szerepet játszik a LTβR az ektópiás PNAd⁺ erek kialakulásában?

Munkám második részében az Nkx2-3^{-/-} egerek beleket vizsgáltuk. Az endoteliális MAdCAM-1 hiány ellenére limfociták eljutnak a mukózális nyirokszövetekbe. Jellemezni és elemezni szeretnénk volna az ebben a folyamatban szerepet játszó különböző faktorokat.

- Milyen addresszin(ek) segítségével jutnak el a limfociták a bél-asszociált nyirokszövetekbe?
- Hogyan befolyásolja a megváltozott addresszin profil a limfoid sejtösszetételt?
- Hogyan befolyásolja a limfocita jelenlét és a LTβR aktivitás modulálása a Peyers-plakkok addresszin profilját Nkx2-3^{-/-} egerekben?

III. Anyag és módszer

Egerek

Kevert alapú 129SvxB6 *Nkx2-3*^{-/-} egereket 14 generáción keresztül tenyésztettünk BALB/c egerekkel. A homozigóta deficiens egereket PCR technikával azonosítottuk. Sejt homing vizsgálatokhoz limfocita donorként BALB/c, GFP-BALB/c és FvBN egereket használtunk. A *LTβR*^{-/-} egerek Dr. Klaus Pfeffertől és Dr. Falk Weih-től származnak. A *RAG-1*^{-/-} egereket a Jackson Laboratories-től vásároltuk. Az *Nkx2-3*^{-/-} x *LTβR*^{-/-} és *Nkx2-3*^{-/-} x *RAG-1*^{-/-} kettős KO egereket az F2 generációban szimultán PCR vizsgálatokkal azonosítottuk *nkx2-3*, *neomycin foszfortranszferáz* és *ltbr* vagy *nkx2-3*, *neomycin foszfortranszferáz* és *rag* primerekkel. Az egerek felhasználása a PTE vonatkozó etikai szabályai szerint történt.

Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia

A limfoid szöveteket eltávolítottuk és fagyasztásukat követően kriosztátban metsztettük, majd acetonnal fixáltuk. Egyszeres és többszörös immunfluoreszcenciát végeztünk különböző jelölt és jelöletlen antitestekkel. A jelöletlen antitesteket jelölt másodlagos antitestekkel detektáltuk. Kontrollként normál patkány immunglobulint használtunk. Kemokinek detektálásához a metszeteket 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A metszeteket fedés után Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, a digitális képeket AnalySis® szoftverrel készítettük. A luminális MAdCAM-1 és PNA_d jelenlét vizsgálatához az egereket intravénásan oltottuk különböző fluorokrómokkal jelölt anti-PNA_d és anti-MAdCAM antitestekkel.

Konfokális mikroszkópia

A konfokális fluoreszcens képeket Olympus Fluoview FV-1000 lézer scanning konfokális imaging rendszerrel készítettük. Kvantifikáláshoz a mintákat 20x objektívvel, 80 μm széles konfokális apertúrával foton-számláló módban vizualizáltuk. Az ábrák teljes pixel intenzitását Fv10-ASW 01.07.03.00 szoftverrel állapítottuk meg.

Elektron mikroszkópia

Eltávolítás után a lépeket 1mm³-nél kisebb darabokba vágtuk, majd szobahőn 3 óráig keresztül 2,5%-os glutáraldehiddel fixáltuk. Ezt követően a szöveteket a PTE Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumban rutin eljárással feldolgozták, aminek során félvékony és ultravékony preparátumokat készítettek. A metszeteket JEOL 1200EX-II elektron mikroszkóppal vizsgáltuk, a negatív képeket digitalizáltuk.

Áramlási citometria

A limfoid szövetekből származó sejtszuspenziót különböző jelölt és jelöletlen antitestekkel inkubáltuk jégen 20 percig. A jelöletlen antitesteket jelölt másodlagos antitestekkel detektáltuk. A méréseket BD FACSCalibur citométerrel végeztük, az adatok elemzése WinMDI 2.8 szoftverrel történt. Az elpusztult sejteket nagyság és granularitás alapján zártuk ki. Mintánként legalább 20 ezer élő sejtet elemeztünk.

***In vitro* sejt-jelölés és -transzfer**

Donor limfocitákat vagy BALB/c egérből izoláltunk és CFSE-vel jelöltünk, vagy pedig GFP-transzgenikus egérből származtak. A recipiens egerek 5×10^7 limfocitát kaptak intravénásan és 30, 60 vagy 120 perccel később a szöveteket áramlási citometriával és immunfluoreszcenciával elemeztük.

Limfocita homing *in vivo* gátlása

A limfocita homing gátlásához először intravénásan különböző anti-addresszin antitestekkel oltottuk a recipiens egereket, majd 30 perccel később 5×10^7 FvBN-eredetű limfocitát adtunk be. 1 órával ezután a recipiens szöveteket áramlási citometriával és szövettannal vizsgáltuk. A donor limfocitákat H-2K^q haplotípusok alapján azonosítottuk.

Kvantitatív RT-PCR (qPCR)

A teljes RNS-t RNeasy Mini Kit-tel izoláltunk DNase I kezelés mellett. A cDNS átírása High Capacity cDNA Archive Kit-tel történt. A PCR reakciók triplikátumokban futottak egy ABI 7500 Real Time PCR System gépen, Power Sybr Green Master Mix használatával. Az adott gének expressziós szintjeit béta-aktinhez normalizáltuk.

Statisztikai analízis

Az adatok analízisét SigmaPlot szoftverrel végeztük, a diagramokat GraphPad Prism segítségével szerkesztettük. Az adatok normál eloszlását Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk. Normál eloszlást mutató változóknál a csoportok közötti analízist egy-szemponos ANOVA-val és post-hoc Tukey teszttel végeztük. Nem normál eloszlású változók esetén Kruskal-Wallis tesztet végeztünk, majd a csoportok páronkénti összehasonlítása Dunn és Student-Newman-Keuls módszerekkel történt. A páronkénti összehasonlítást normál eloszlás esetén t-próbával, egyéb esetekben Mann-Whitney U teszt végzésével elemeztük. Az ábrákon az adatok átlag és az átlag hibájával vannak jelen (átlag \pm SEM). A kvantitatív RT-PCR eredményeket REST 2009 szoftverrel elemeztük. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

IV. Eredmények

IV.1. Nkx2-3 hiányának hatása a lép szerkezetére

IV.1.1. LYVE-1⁺ struktúrák Nkx2-3^{-/-} egér lépében

Az Nkx2-3^{-/-} lépék részletes szövettani és elektronmikroszkópos elemzése során a lépék perifériális területeiben zsákszerű képleteket észleltünk. Ezek a struktúrák limfoid sejteket tartalmaztak, nyirokerekre hasonlítottak, endotel megjelenésű sejtjeik pedig LYVE-1⁺ (limfatikus endotel marker) és VEGF-R2⁺ (endoteliális marker) fenotípust mutattak, viszont a limfatikus endotelre specifikus Prox1 transzkripciós faktor nem volt kimutatható.

IV.1.2. Nyirokér-asszociált marker gének mRNS szintje emelkedett Nkx2-3^{-/-} lépben

Összehasonlítottuk Nkx2-3^{-/-} és vad típusú egerek lépében különböző limfatikus endotél-asszociált fehérjék mRNS szintjeit. A mutáns lépekben a LYVE-1 fehérjét és podoplanint kódoló mRNS szintek szignifikánsan emelkedtek normal léphez képest, és hasonlítottak a vad típusú pLN-ben és mLN-ben látottakhoz. A Prox1 mRNS szintek nem mutattak eltérést a két genotípusú lép között. Az Flt4 (szintén limfatikus endotel marker) szintje nem tért el sem a vad típusú lépben, sem a vad típusú pLN-ben észleltektől.

IV.1.3. LYVE-1⁺ struktúrák belső tartalma és stromális mikrokönyezete

Immunfluoreszcens festések alapján a LYVE-1⁺ zsákok körül MARCO⁺ és szialoadhezin/CD169⁺ makrofágok kis csoportjai helyezkedtek el. Az ER-TR7⁺ retikuláris fibroblasztok szorosan szoros gyűrűt alkottak a LYVE-1 kapillárisok körül. A nyirokér-zsákok nagyrészt T-sejteket tartalmaztak, elsőt B-sejtekkel.

IV.1.4. Keringő limfociták korlátozott belépése a LYVE-1⁺ cisztákba

CFSE⁺ limfocitákat intravénásan oltottunk Nkx2-3^{-/-} egerekbe. 20 perccel később csupán a sejtek ~2,3%-a helyezkedett el a LYVE-1⁺ stuktúrákon belül, míg 8 órával az oltás után ez az arány 12,1%-ra emelkedett. Ezek az adatok azt jelzik, hogy nincs közvetlen összeköttetés a keringés és a zsákok között, a sejtek közvetett úton lépnek be a LYVE-1⁺ képletekbe.

IV.1.5. A LYVE-1⁺ struktúrák megjelenése és a lép érmintázat-váltása embrionális és korai posztnatális Nkx2-3^{-/-} egérben

Embrionális 18,5 napos (E18,5) életkorú mutáns egerek lépében csak elsőt LYVE-1⁺ sejteket láttunk, melyek nem alkottak zsákokat. Posztnatális 0,5 napos (P0,5) korban LYVE-1⁺ szerkezetek a lépék centrális régióiban helyezkedtek el és a felnőttre jellemző fenotípust P10 korban érték el. Vad típusú embrionális lépben egyáltalán nem voltak jelen LYVE-1⁺ struktúrák.

Az Nkx2-3 hiánya ektópiás PNA⁺ HEV-ek megjelenéséhez vezet a lépben. P0,5 napos korban mind vad típusú, mind mutáns lépben találtunk MAdCAM-1⁺ sejtcsoportokat. Nkx2-3^{-/-} lépekben a vad típusú pLN-ekhez hasonlóan az endoteliális MAdCAM-1 fokozatosan eltűnik és a posztnatális 2. hétre a helyét a PNA⁺ teljesen átveszi. Vad típusú lépben MAdCAM-1 reaktivitás a marginális szinuszokban volt látható, míg PNA⁺ expressziót nem észleltünk.

IV.1.6. A LTβR aktiváció szerepe LYVE-1⁺ ciszták és a PNA⁺ HEV kialakulásában

A LYVE-1⁺ struktúrák és a PNA⁺ HEV-ek LTβR-függésének vizsgálatához Nkx2-3^{-/-} x LTβR^{-/-} kettős mutáns egereket hoztunk létre. Felnőtt kettős KO egerek lépében a LYVE1⁺ struktúrák jelen voltak, míg PNA⁺ HEV-eket nem találtunk. Újszülött vad típusú egereknek adott LTβR-Ig fúziós fehérje hatékonyan gátolta a MAdCAM-1⁺ marginális szinusz kialakulását a lépben, míg Nkx2-3^{-/-} egerekben a kezelés hatására elmaradt a PNA⁺ HEV képződés.

Ezen eredmények arra utalnak, hogy az Nkx2-3^{-/-} lép vaszkulaturájának átalakulása a nyirokcsomó erezetéhez hasonló fejlődésbeli programot követ.

IV.1.7. A MARCO⁺ follikuláris vezetékrendszer károsodása Nkx2-3^{-/-} lépben

Korábbi eredmények károsodott marginális zónát (MZ) mutattak ki Nkx2-3^{-/-} egerek lépében. Munkánkban azt találtuk, hogy a MZ makrofágok mellett vad típusú egerek lépében a MARCO receptor (macrophage receptor with collagenous structure) egy granulált mintázatú megoszlásban a follikulusokban is megjelenik. A MARCO széles körű ligandkötő képességgel rendelkezik és szerepet játszik a MZ B sejteknek a lépben való retenciójához. Többszörös immunfluoreszcens vizsgálatokkal kimutattuk, hogy normál lépben a follikuláris MARCO expresszió follikuláris dendritikus sejthez (FDC) kötött, T-sejtes zónában nem látható és független a T-sejtes ER-TR7⁺ vezetékrendszertől.

A marginális zónát vagy fehér pulpát érintő különböző mutációkkal rendelkező egereken többszörös immunfluoreszcens festésekkel tovább vizsgáltuk a follikuláris MARCO megjelenésének celluláris feltételeit. Nkx2-3^{-/-} egér lépében jelen vannak FDC-k, míg a MAdCAM-1⁺ marginális szinusz és a MARCO⁺ MZ makrofágok hiányoznak. Ezekben az egerekben nem találtunk follikuláris FDC-asszociált MARCO expressziót, csak elszórtan voltak jelen MARCO⁺ sejtek az FDC-k körül. Ez a festődési mintázat nem hasonlított a vad típusban látotthoz. Ezenkívül azt találtuk, hogy a MARCO follikuláris megjelenése nem függ össze a MZ B sejtek vándorlásával. Másrészt viszont a fejlődő fehér pulpába irányuló, CXCR5/CXCL13-mediálta B-sejt migráció szükséges az FDC-asszociált MARCO jelenléthez.

Összegezve ezek az adatok arra utalnak, hogy a follikuláris MARCO expresszió feltétele mind a MZ makrofág, mind az érett FDC jelenléte, utóbbi kialakulása viszont a B-sejtek follikuláris felhalmozódásához kötött.

IV.2. Nkx2-3 hiányának hatásai bél-asszociált nyirokszövetekben

IV.2.1. Megváltozott HEV-asszociált gének mRNS szintjei felnőtt Nkx2-3^{-/-} egér bél-asszociált nyirokszöveiben

A Peyer-plakkokban történő limfocita recirkulációnak a feltétele az endoteliális MAdCAM-1-nek a limfocita felszínen lévő α4β7 integrin általi felismerése. Nkx2-3^{-/-} egerekben az endoteliális MAdCAM-1 hiányzik, a vékonybélben kevesebb és kisebb Peyer plakkok találhatók. A strukturált limfoid szövetek jelenléte viszont arra utal, hogy a limfociták egy MAdCAM-1-független módon érik el ezeket a szöveteket. Feltételezésünk szerint a léphez hasonlóan az Nkx2-3^{-/-} egerek belében PNA⁺ HEV-ek lehetnek jelen.

Először a PNA⁺ epitópot létrehozó vázfehérjék és módosító enzimek mRNS szintjeit elemeztük. Érdekes módon MAdCAM-1 mRNS szignifikánsan emelkedett a mutáns PP-okban az endoteliális hiány ellenére. A vázfehérjék többsége változó

mértékben magasabb volt a vad típusú PP-hoz képest. A módosító enzimek közül néhány szignifikánsan emelkedett, míg mások nem változtak jelentősen. Összesítve, míg a PNAd kialakításában szerepet játszó gének többsége szignifikánsan emelkedett, ez a növekedés nem érte el a mutáns lépben látott változásokat.

IV.2.2. PNAd⁺ HEV megjelenése az Nkx2-3^{-/-} egerek bél-asszociált nyirokszöveiteiben

Vad típusú és mutáns PP metszeteket különböző anti-addresszin antitestekkel festettünk. A pán-endotél marker VEGF-R2 normál mértékű erezettséget mutatott mutáns Peyer plakkokban. A korábbi eredményeknek megfelelően minimális endoteliális MAdCAM-1 pozitívítást láttunk, míg a stromális sejteken jelentős MAdCAM-1 reaktivitást figyeltünk meg, ami magyarázhatja az emelkedett MAdCAM-1 mRNS-t mutáns PP-ben. Szemben a normál PP-vel, ahol PNAd alig volt látható, a mutáns PP-ben intenzív endoteliális festődést figyeltünk meg. Érdekes módon a PNAd jelenléte a limfoid szövetekre korlátozódott.

B-sejt elleni (anti-B220) és T-sejt elleni (anti-Thy-1) antitesttel megállapítottuk, hogy az Nkx2-3^{-/-} PP-ban a mutáns HEV-ek a normál MAdCAM-1⁺ HEV-ekhez hasonló territoriális eloszlást mutatnak.

PNAd-ellenes és MAdCAM-1-ellenes antitestek intravénás oltásával azt állapítottuk meg, hogy az Nkx2-3^{-/-} egérben látott PNAd expresszió luminális elhelyezkedésű. A szoftverrel számszerűsített PNAd:MAdCAM-1 fluoreszcencia arány jelentősen magasabb volt mutáns PP-ben vad típushoz képest és megközelítette mind a vad típusú, mind az Nkx2-3^{-/-} nyirokcsomóban látottakat. Ez arra utal, hogy az elszórt endoteliális MAdCAM-1 expresszió az endotél sejtek abluminális felszínére korlátozódik, és így nem vesz részt a sejtek recirkulációjában.

IV.2.3. Homeosztatis kemokin expresszió Nkx2-3^{-/-} Peyer-plakkban

Az addresszinek mellett különböző kemokinek is befolyásolják a limfociták recirkulációját. A T-sejteket vonzó CCL21 kemokin az Nkx2-3^{-/-} egérben a normálhoz hasonló megoszlást mutatott, míg az elsősorban a folliculusokban expresszálódó CXCL13 valamelyest gyengébben festődött Nkx2-3^{-/-} Peyer plakkban.

IV.2.4. Megváltozott sejtösszetétel Nkx2-3^{-/-} Peyer-plakkokban

Áramlási citométerrel elemeztük a mutáns PP sejtösszetételét. Nkx2-3^{-/-} PP-ban szignifikánsan alacsonyabb B-sejt számot és enyhén emelkedett T-sejt számot találtunk, mely megoszlás a pLN sejtösszetételhez hasonlít. A T-sejtek memória fenotípusában és a folliculáris helper T-sejtek számában nem volt eltérés. Érdekes módon Nkx2-3^{-/-} PP-ban jelentősen emelkedett regulatorikus T-sejt számot észleltünk. Az L-selectin mennyisége a limfociták felszínén emelkedett, ami megfelel a PNAd általi homing mechanizmusnak.

IV.2.5. PNAd⁺ HEV-ek megjelenésének kinetikája Nkx2-3^{-/-} Peyer-plakkban

Normál újszülött egerekben a pLN HEV-eken először MAdCAM-1 expresszálódik, amit az első posztnatális hónap végére vált fel a PNAd. Ismert, hogy újszülött Nkx2-3^{-/-} egerek hasi nyirokcsomóinak (mLN) HEV-jei is MAdCAM-1 pozitívak. A mutáns egerek addresszin-mintázatát újszülött, 1 hetes és 2 hetes korú vad típusú és Nkx2-3^{-/-} PP metszeteinek immunfluoreszcens festésével vizsgáltuk.

Újszülöttkorban mind a vad típusú, mind a mutáns PP-ban észleltünk endoteliális MAdCAM-1-t a limfoid és nem-limfoid ereken egyaránt. 1 hetes Nkx2-3^{-/-} egerekben megjelenik a PNAd és nagyrészt MAdCAM-1-gyel együtt mutatkozik a PP-ban, ugyanakkor a lamina propria ereken nincs PNAd expresszió. A 2. hétre a a PP-ban és mLN-ban eltűnik a MAdCAM-1 expresszió. A nem-limfoid lamina propria ereken PNAd egyáltalán nem jelent meg. Vad típusú egerekben mindvégig a MAdCAM-1 marad a domináns addresszin.

IV.2.6. A limfoid sejtek és a LTβR szerepe a PNAd⁺ HEV megjelenésében

Vad típusú egérben a PNAd⁺ HEV-ek LTβR-függő módon jelennek meg és maradnak fenn. Nkx2-3^{-/-} egerekben a PNAd a bélnek csak azon területek erein jelenik meg, melyek limfoid kolonizációt mutatnak, ezért megvizsgáltuk a PNAd expresszió LTβR- és limfocita-függését. Nkx2-3^{-/-} egerek és RAG-1^{-/-} egerek keresztezésével olyan 2xKO egereket hoztunk létre, melyek az Nkx2-3 hiánya mellett érett T- és B-sejtekkel sem rendelkeznek. A létrehozott [Rag1^{-/-}] x [Nkx2-3^{-/-}] egerek belében kisméretű CD45⁺ sejtszoptortokat láttunk, melyek csak minimális endoteliális MAdCAM-1 expressziót mutattak. Érdekes módon PNAd expresszálódott a HEV-eken, bár az Nkx2-3^{-/-} egérhez képest kisebb mértékben. Ezután Nkx2-3^{-/-} újszülött egereket a LTβR-aktivációt megakadályozó LTβR-Ig fúziós fehérjével intraperitoneálisan oltottunk a posztnatális 1., 3., és 5. napokon, majd a 14. napon elemeztük az egerek belét. A kontrollhoz képest a kezelt állatokban mind a PNAd, mind a MAdCAM-1 hiányzott a CD45⁺ sejtszoptortosulásokból.

Összesítve ezek az eredmények arra utalnak, hogy Nkx2-3^{-/-} PP-ban a PNAd LTβR-függő módon jelenik meg. A limfotoxin ligandokat non-B- és non-T-sejtek is biztosíthatják, viszont az érett limfociták jelenléte hozzájárul a PNAd expressziójának fokozásához, mivel hiányukban csökkent a PNAd kifejeződésének mértéke.

IV.2.7. A limfociták kötődése a PNAd⁺ HEV-ekhez Nkx2-3^{-/-} Peyer plakkokban

A HEV-eken megfigyelt addresszin-módosulás funkcionális következményének vizsgálatára sejt transzfer vizsgálatokat végeztünk. A GFP-expresszáló vagy CFSE-jelölt donor limfocitákat intravénásan oltottuk vad típus és mutáns egerekbe, a recipiens szöveteket pedig 30, 60 és 120 percnél elemeztük szövettannal és áramlási citometriával. 1 órával oltás után BALB/c egerekben a donor limfociták a MAdCAM-1⁺ erekhez kötődtek, míg Nkx2-3^{-/-} PP-ban a PNAd⁺ HEV-ekhez. A szövettani képek részletes elemzése kimutatta, hogy a mutáns egérben szignifikánsan több sejt helyezkedett közvetlenül az erek közelében, ami lassabb endoteliális transzmigrációra utal.

Áramlási citometriás mérések mind vad típusú, mind Nkx2-3^{-/-} PP-ban jelentős T-sejt dominanciát mutattak a bejutott sejtek között. Mutáns egerekben szignifikánsan alacsonyabb volt a B-sejtek aránya normálhoz képest, míg a citotoxikus T-sejtek nagyobb arányban voltak jelen. Érdekes módon mind normál, mind mutáns egerekben jelentősen alacsonyabb volt a donor B-sejtek aránya a rezidens B-sejtekhez képest. A megtapadt donor sejtek többsége mindkét egérben helper T-sejtek voltak.

IV.2.8. A PNAd szerepe a limfoid sejtek belépésében az Nkx2-3^{-/-} Peyer-plakkokba

Megvizsgáltuk, hogy az Nkx2-3^{-/-} egérben a recirkuláló limfociták PP-be történő belépése milyen mértékben függ a PNAd hatékony felismerésétől. Vad típusú és mutáns

egereknek anti-PNAd és anti-MAdCAM-1 antitesteket adtunk be önmagukban vagy kombinációban, amit limfociták oltása követett 30 perccel később. Kontrollként normál patkány immunglobulinnal oltottuk az egereket és ehhez hasonlítottuk a bejutott sejtek arányát.

Normál lépbe történő limfocita-homingot a beadott antitestek egyike sem befolyásolta. A PNAd-ellenes MECA-79 antitest jelentősen gátolta a sejtek bejutását a mutáns lépbe, megerősítve a limfociták mutáns lépbe való eljutásának L-szelektin függő megváltozására tett megfigyelésünket. A PNAd gátlása mind vad típusú, mind mutáns nyirokcsomóknál gátolta a sejtek bejutását, bár $Nkx2-3^{-/-}$ PP-ben a gátlás mértéke kisebb volt. Az anti-MAdCAM-1-kezelés nem befolyásolta a pLN-be való bejutást egyik genotípusú recipiensben sem. Vad típusú mLN-ben mindkét kezelés szignifikánsan gátolta a sejtek megjelenését, míg $Nkx2-3^{-/-}$ mLN-ben csak az anti-PNAd járt hatással, ami megfelel ez endoteliális MAdCAM-1 hiányának.

A vad típusú Peyer plakkba történő homingot az anti-MAdCAM-1 kezelés jelentősen csökkentette, viszont az anti-PNAd hatástalan volt. Ezzel szemben $Nkx2-3^{-/-}$ egerben a MAdCAM-1 gátlása nem járt hatással, míg anti-PNAd beadása szignifikáns limfocita-megtapadás csökkenéshez vezetett. Ez a csökkenés viszont nem érte el sem az anti-MAdCAM-1 hatását normál PP-ben, sem az anti-PNAd hatását vad típusú pLN-ben. Az anti-MAdCAM-1 és anti-PNAd antitestek kombinálása nem növelte a gátlás mértékét.

V. Diskusszió

Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor hiányában különböző nyirokszöveteknek mind a vér érpályái, mind a nyirokerezete károsodott, ami több morfológiai és funkcionális következményhez vezetett. A lépben az ektópiás PNAd⁺ HEV-ek megléte mellett a perifériás régiókban T-sejteket tartalmazó LYVE-1⁺ endotél zsákokat láttunk. Ezek a zsákok nem rendelkeztek közvetlen összeköttetéssel a keringéssel.

A nyirokcsomókhöz képest jelentősen kevesebbet tudunk a lép érfejlődéséről. Nkx2-3^{-/-} egerekben gátolt a vörös pulpa érszerkezetének fejlődése, valamint a marginális szinusz kialakulása is elmarad [Balogh és tsai, 2007]. Érdekes módon Nkx2-3 csak embrionális korban aktív és expressziója a lépben már születés előtt lecsökken [Wang és tsai, 2000], ami arra utal, hogy az embrionális hiánya későbbi periódusban vált ki hatásokat. Mivel *in silico* analízisek lehetséges Nkx2-3 kötőhelyeket mutattak ki a LYVE-1 promóter régiójában, felmerül, hogy az Nkx2-3 a LYVE-1 negatív regulátora. A limfatikus endotél irányába elkötelezett sejtek érését a Prox1 transzkripciós faktor befolyásolja és LYVE-1, valamint podoplanin expressziójával jár. Real-time PCR eredmények alapján látszik, hogy szemben a LYVE-1 szintekkel, Nkx2-3^{-/-} lépben a Prox1 expressziója alacsonyabb volt. Ezek alapján a LYVE-1⁺ képletek jelenléte nem új limfatikus endotélsejtek differenciálódásának a következménye, hanem inkább embrionális endotél sejtek [Kaipainen és tsai, 1995] maradványai. Ezt a kérdést egyértelműen a Cre-Lox rendszerrel lehet eldönteni, ahol a Cre rekombinázt a Prox1 promótere hajtáná, és ezáltal pontosabb fate-mapping válna lehetségessé [Srinivasan és tsai, 2007].

A lépben a vaszkuláris eltérések mellett azt találtuk, hogy a normál lépre jellemző follikuláris MARCO expressziós mintázat hiányzik. Feltételezzük, hogy ennek az Nkx2-3^{-/-} egérben korábban leírt marginális zóna makrofágok hiánya lehet az oka. Az érett FDC-vel nem rendelkező RAG1^{-/-} egérben és a komplex marginális zóna, valamint follikuláris eltérésekkel rendelkező LTβR^{-/-} egérben sem fordul elő follikuláris MARCO. Együtt ezek az adatok arra utalnak, hogy a MARCO-nak a follikuláris lerakódásához érett FDC-k és MARCO⁺ MZ makrofágok megléte szükséges. Az FDC-asszociált granuláris MARCO rajzolat élesen elkülönült a T-sejtes zónára jellemző ER-TR7⁺ vezetékrendszerrel és csak a follikulában volt jelen. Hipotézisünk szerint a MARCO passzívan rakódik le a MZ makrofágoiról az FDC-k felszínére, ahol a MARCO a B-sejtes választ különböző kölcsönhatásokkal tudja befolyásolni [El Shikh és tsai, 2007]. Így a MARCO fontos szerepet játszhat a follikulák és a MZ közti kapcsolatban és elősegítheti különböző antigének transzportját. Nkx2-3^{-/-} egerekben ennek hiánya részben felelős lehet a korábban leírt károsodott immunválaszért [Tarlinton és tsai, 2003].

Korábbi észleléseknek megfelelően az Nkx2-3^{-/-} egerek bél nyálkahártya ereiben hiányzott az endoteliális MAdCAM-1, ami a nyirokszövetekben a PNAd-et alkotó vázfehérjék és módosító enzimek kompenzatórikus emelkedett szintjéhez vezetett, ami az endotél-sejtek jelentékeny plaszticitására utal. Ez az észlelés, valamint az [Nkx2-3^{-/-}] x [Rag1^{-/-}] kettős mutáns egérben és Nkx2-3^{-/-} bélben LTβR-Ig fúziós fehérje oltását követően látott HEV fenotípus kihangsúlyozza a LTβR fontos szerepet a HEV fejlődésében és fenntartásában. [Nkx2-3^{-/-}] x [Rag1^{-/-}] kettős mutáns egerekben a CD11c⁺ dendritikus sejtek [Moussion és Girard, 2011] és a RORγt⁺ veleszületett limfoid sejtek [Tumanov és tsai, 2011] működhetnek potenciális limfotoxin forrásokként.

Az endoteliális MAdCAM-1 jelenléte újszülött Nkx2-3^{-/-} PP-ban, majd az első posztnatális hónap során bekövetkező MAdCAM-1/PNAd addresszin váltás a vad típusú pLN-ben látott addresszin váltáshoz [Mebius és tsai, 1996] hasonlítható. Mivel ebben az életkorban Nkx2-3 nem expresszálódik ezekben a szövetekben, feltételezhető, hogy az Nkx2-3 a MAdCAM-1/PNAd váltás gátlója. Ezt erősíti, hogy míg PP és mLN endotélisejtekben nagy mennyiségű Nkx2-3 mRNS mutatható ki, addig az csak minimálisan van jelen felnőtt vad típusú pLN HEV-ben. Kimutatták, hogy vad típusú egerben mind HEV, mind non-HEV kapillaris sejtek expresszálják Nkx2-3-t, míg MAdCAM-1 csak a HEV-ekben volt jelen [Lee és tsai, 2014]. Ez az FDC-asszociált MAdCAM-1 jelenléttel együtt hangsúlyozza az Nkx2-3 sejtvonalspecifikus hatásait. Mindezek fényében és a korai posztnatális Nkx2-3^{-/-} PP-okban látott MAdCAM-1⁺/PNAd⁺ erek tükrében valószínűbb, hogy a felnőtt Nkx2-3-deficiens Peyer plakkokban látott PNAd⁺ HEV-ek a MAdCAM-1⁺ szakaszokból alakulnak ki, és nem MAdCAM-1⁻ kapillaris sejtekből képződnek újonnan.

Nkx2-3^{-/-} egerekben az anti-PNAd antitesttel való kezelés kisebb mértékben csökkentette a PP-ba jutó sejtek számát, mint vad típusú és mutáns pLN-ben és nem érte el az anti-MAdCAM-1 kezelés hatékonyságát normál PP-ban sem. Ez egyéb, a PNAd mellett jelenlévő kompenzációs mechanizmusokra utal. Sem az ICAM-1, sem a VCAM-1 addresszin nem tűnik valószínű jelöltnek, mivel sem szövettanon, sem RT-PCR-on nem láttunk fokozott jelenlétet.

Humán IBD-s betegekben emelkedett MAdCAM-1 expressziót írtak le [Arihiro és tsai, 2002]. Különböző B-sejt vonalokból származó adatok fokozott Nkx2-3 aktivációt mutattak ki IBD-s páciensek esetén, ami megmagyarázná az emelkedett MAdCAM-1 jelenlétet. A mi eredményeink alapján viszont a korábbi közvetlen aktivációs elmélethez képest a MAdCAM-1 Nkx2-3 általi regulációja bonyolultabb folyamat. Emellett fontos megemlíteni, hogy a Crohn betegség és a colitis ulcerosa is komplex, multifaktoriális betegségek, ahol az emelkedett MAdCAM-1 jelenlét éppúgy lehet következménye, mint okozója egy fokozott gyulladási állapotnak.

Összegezve, adataink arra utalnak, hogy az Nkx2-3 egyaránt fontos szereplője a vér- és a nyirok-endotélisejtek differenciációjának. A lépben és a Peyer plakkokban az Nkx2-3 transzkripciós faktor hiányában látott hasonló morfológiai eltérések az Nkx2-3 szisztémás, perifériás nyirokcsomó vaszkuláris mintázat kialakulását gátló szerepét sugallják. Perifériás nyirokcsomókban, ahol Nkx2-3 nincs jelen, PNAd⁺ magas endotélis vénulák alakulnak ki, míg ahol normálisan expresszálódik Nkx2-3, nem jelenik meg a PNAd. Mind a MAdCAM-1 endoteliális hiányának, mind az ektópiás PNAd jelenlétének lehet klinikai relevanciája és érdemes tovább vizsgálni. További munkák ezen az egermodellen és olyan állapotokban is, ahol fokozott az Nkx2-3 aktivitása, segíthetnek még jobban megérteni a HEV-ek kialakulását és plaszticitását. A HEV-ek differenciációján keresztül a másodlagos (és harmadlagos) nyirokszövetek kialakításában játszott központi szerep hangsúlyozza az Nkx2-3 befolyását a megfelelő immunválasz kialakítására, ami jövőbeni terápiás lehetőségeket vet fel.

VI. Eredmények rövid összefoglalója

1. LYVE-1⁺ ciszták jelenléte Nkx2-3^{-/-} lépekben

- Nkx2-3^{-/-} lépek LYVE-1⁺ zsákszerű struktúrákat tartalmaznak, melyek nagyrészt a mutáns lépek perifériás részére lokalizálódnak és főleg T-sejteket tartalmaznak.

- Nincs direkt összeköttetés a limfatikus zsákok és a vérkeringés között, mivel a beoltott sejtek csak későn és kismértékben jelentek meg a ciszták belsejében.

- LYVE-1-pozitív érszegmentumok már az Nkx2-3^{-/-} embriókban is jelen vannak, míg a zsákszerű képződmények először újszülöttekben figyelhető meg és a felnőttre jellemző fenotípus a második posztnatális héten alakul ki.

- [Nkx2-3^{-/-}] x [LTβR^{-/-}] kettős mutáns egerekben is jelen vannak a LYVE-1⁺ struktúrák és ezek fejlődése független a LTβR-on keresztüli szignalizációtól.

2. Nkx2-3^{-/-} lépben hiányzik a folliculáris MARCO expresszió

- Amellett, hogy a lép marginális zóna makrofágok egy alcsoportján expresszálódik a MARCO, FDC-asszociált módon a lép folliculusaiban is megtalálható fibrilláris rajzolattal. Nkx2-3^{-/-} egerek lépében a folliculáris MARCO-mintázat hiányzik.

3. Nkx2-3 deficiens egér Peyer plakkjaiba PNAd felismerésével jutnak el a limfociták

- Nkx2-3^{-/-} egerek Peyer-plakkjaiban a PNAd epitópot létrehozó vázfehérjék és módosító enzimek mRNS szintjei emelkedtek, ami luminális HEV PNAd-expresszióként manifesztálódik. A mutáns egerekben a kemokin profil nem tér el a normálistól.

- A mutáns Peyer-plakkok több T-sejtet tartalmaznak, ezen belül is magasabb a regulatórikus T-sejtek aránya.

- Újszülött Nkx2-3^{-/-} egerek Peyer-plakk HEV-jein MAdCAM-1 expresszálódik, ennek a helyét a második posztnatális hétre fokozatosan veszi át a PNAd.

- A PNAd LTβR-függő módon jelenik meg, de ehhez érett T- és B-sejtek nem szükségesek.

- Sejt-transzfer kísérletek azt mutatták, hogy az Nkx2-3^{-/-} Peyer plakkokba bejutó sejtek nagy része T-sejt. A sejtek beadását megelőző anti-PNAd kezelés hatékonyan gátolta a mutáns Peyer-plakkokba történő limfocita homingot.

VII. Publikációk listája

A tézis alapjául szolgáló közlemények

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

IF: 2,725

Czömpöly T, Lábadi A, **Kellermayer Z**, Olasz K, Arnold HH, Balogh P. 2011. Transcription factor Nkx2.3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen. *J. Immunol.* 186:6981–9.

IF: 5,788 (ebből 2.894 IF-t használtam a tézishez)

Kellermayer Z, Fisi V, Mihalj M, Berta G, Kóbor J, Balogh P. 2014. Marginal zone macrophage receptor MARCO is trapped in conduits formed by follicular dendritic cells in the spleen. *J Histochem Cytochem* 62:436-449.

*IF: 2,403**

Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O’Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, Balogh P. 2014. Absence of Nkx2-3 homeodomain transcription factor reprograms the endothelial addressin preference for lymphocyte homing in Peyer’s patches. *J. Immunol.* 193:5284-93.

*IF: 5,362**

Egyéb közlemény

Mihalj M, **Kellermayer Z**, Balogh P. 2013. Follicles in gut-associated lymphoid tissues create preferential survival niches for follicular Th cells escaping Thy-1-specific depletion in mice. *Int Immunol.* 25:423-35.

IF: 3,181

Összes IF: 19,459 *Becsült IF a 2013-as adat alapján

IX. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Balogh Péternek** a segítségét és motivációját, aki már TDK-s koromtól kezdve támogatta és vezette munkámat.

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Németh Péternek** és **Prof. Dr. Berki Tímeának** a lehetőséget, hogy PhD tanulmányaimat és kutatásaimat elvégezhettem az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben.

Nagyra értékelem **Heidt Diána** segítségét.

Hálás vagyok **Dr. Martina Mihaljnak** és **Dr. Lábadi Árpádnak** a közös munkák során nyújtott szakmai segítségért.

Szeretnék köszönetet mondani az **Immunológiai és Biotechnológiai Intézet** valamennyi kedves munkatársának.

Végül szeretném megköszönni **Családomnak** és **Barátaimnak** mindazt a sok támogatást és segítséget amit nap mint nap kapok.