

**AZ NKX2-3 TRANZKRIPCIÓS FAKTOR SZEREPE
A BÉL-ASSZOCIÁLT NYIROKSZÖVETEK
VELESZÜLETETT LIMFOID SEJT-MEGOSZLÁSÁNAK
ÉS A GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉGEK LEFOLYÁSÁNAK
SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Doktori (PhD) értekezés

Vojkovics Dóra

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Témavezető: Prof. Dr. Balogh Péter, egyetemi tanár
Programvezető: Prof. Dr. Németh Péter, egyetemi tanár
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem
Klinikai Központ
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet



Pécs, 2019

1. Bevezetés

1.1 A gyulladásoos bélbetegségek

A gyulladásoos bélbetegséget (IBD) az egyik leggyakrabban előforduló krónikus gyulladásoos kórfolyamatként tartják számon, amely leggyakrabban fiatal felnőttekben alakul ki, 15-30 éves kor között. Két fő típusát különböztethetjük meg, ezek a Crohn betegség (CD) és a colitis ulcerosa (UC) vagy fekélyes vastagbélgyulladás. (*Loftus és tsai 2002*) Mindkét betegség kialakulásához hozzájárulhatnak bizonyos genetikai és környezeti faktorok. (*Fisher és tsai, 2008; Cho és tsai, 2007*)

Az elmúlt években GWAS, meta-analízis és „fine-mapping” módszerek segítségével számos, IBD-vel összefüggésbe hozható lókuszt azonosítottak. (*Verstockt és tsai 2018; Liu és tsai, 2015; Zhang és tsai, 2018*) A több száz azonosított genetikai eltérés -többnyire egy pontos nukleotid polimorfizmus (SNP)- ellenére, csak kevésről sikerült bizonyítani, hogy valós biológiai szerepük van az IBD kialakulásában. Ezek egyike a homeodomén-típusú transzkripciós faktor Nkx2.3 kódoló régiójának SNP-je, melyet CD és UC előfordulásával is társították. (*Parkes és tsai, 2007; Fisher és tsai, 2008*)

A genetikai és környezeti tényezők összessége a mikrobiom összetételének változását, az epitél barrier funkciójának csökkenését okozhatja, valamint az immunrendszer kóros aktivációjának köszönhetően gyulladást indukálhat. (*Loftus és tsai 2002*)

Az egyénre jellemző bél mikrobiom fontos szerepet játszik a szervezet megfelelő tápanyagfelvételének biztosításában, valamint az emésztőcsatorna immunrendszerének kialakításában és szabályozásában. (*Bäckhed és tsai, 2005*) A gazdaszervezet és a mikrobiomot alkotó baktériumok közötti kényes egyensúly felborulása súlyos gyulladásoos folyamatok kialakulásához vezethet. (*Elson és tsai, 2005*)

Az epitél sejtek biztosítják, hogy az emésztőcsatornában található bakteriális és más antigének csak korlátozott számban legyenek hozzáférhetőek a mukózális immunrendszer számára. IBD-ben ez a barrier funkció a bélfal permeabilizációjának növekedése következtében sérül, ennek következményeképpen pedig gyulladás alakulhat ki. (*Wang és tsai, 2006*)

A GALT sejtek normál körülmények között hozzájárulnak az immunológiai homeosztázis fenntartásához, IBD-ben viszont a megnövekedett permeabilitású epitél barrieren keresztül nagy számban beáramló bakteriális és más antigének hatására gyulladásoos folyamatokat indukálhatnak. A mukózában való felszaporodásuk és túlzott aktivációjuk gyulladásoos faktorok nagymértékű termelését vonja maga után.

Az immunsejtek szabályozott bélbe vándorlása az ér-endotél hálózaton keresztül valósul meg $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-1 interakció révén. Krónikus gyulladás során az emelkedett adhézións molekula és gyulladásoos faktor expresszió következtében a limfoid sejtek nagy számban fognak a bélbe vándorolni, emellett a limfociták magas arányú bél homingját a gyulladásoos kemokinek emelkedett szintje is előidézheti. (*Hatoum és tsai, 2006*)

Az Nkx2-3 transzkripciós faktor szabályozza a MAdCAM-1 adresszin kifejeződését, amely a leukociták felszínén kifejeződő $\alpha 4\beta 7$ bél homing receptoron keresztül lehetővé teszi a limfoid sejtek bélbe történő vándorlását. (*Iwata és tsai, 2004*) Ezen endotél faktorok hiányában a bélbe történő limfocita homingban zavar keletkezik, amely hatással van a helyi immunválasz és a gyulladásoos folyamatok lefolyására. (*Pabst és tsai, 2000*) Az Nkx2-3 tehát a bél-nyálkahártya ér-adresszin mintázatának befolyásolásán keresztül kapcsolatba hozható az IBD kialakulásával.

1.2 A bél-asszociált nyirokszövetek fejlődésbiológiai jellemzői

A bél-asszociált nyirokszövetek (GALT) fontos szerepet játszanak a bél helyi immunológiai homeosztázisának fenntartásában, gyulladásoos, valamint szisztémás immunológiai folyamatok szabályozásában. Szerkezetük kialakulása és fenntartása számos

összetevő együttes szabályozásán keresztül valósul meg. Ezek a másodlagos nyirokszervek találkozáspontként szolgálnak az immunrendszer sejtjei és az antigének számára, így nélkülözhetetlenek a megfelelő immunválasz indukálásában.

Az organizált GALT-hoz a mezenterialis nyirokcsomók, Peyer plakkok (PP) colon plakkok (ColP) és SILT-ek (szoliter intesztinális nyirokszövetek) tartoznak, a diffúz GALT-ot pedig a lamina propria (LP) területében, valamint az intraepiteliális limfociták (IEL) és más itt elhelyezkedő immunkompetens sejtek összessége alkotja.

A mezenterialis nyirokcsomók PP-ok és ColP-ok programozott kialakulása már embrionális korban megkezdődik, ezzel szemben a SILT-képződés posztnatális korban indukált módon megy végbe. Kialakulásukhoz nélkülözhetetlen a limfoid szövet szervező (LTo) mezenchimális strómasejtek és a hematopoetikus limfoid szövet indukáló (LTi) sejtek közti kölcsönhatás. Az LTi sejtek $LT\alpha\beta 2$ -t expresszálnak, amely az LTo sejtek $LT\beta R$ ligandjaként funkcionál. A LT jelátvitel az NF- κB útvonalak aktiválásával az egyik legfontosabb pontja a nyirokcsomók és PP-ok fejlődésének. Az NF- κB útvonal aktiválása indukálja az LTo sejtek által expresszált adhéziós molekulák kifejeződését, valamint számos citokin expresszióját is elősegíti. Ezek a faktorok kezdetben az LTi sejtek, majd később az érett T és B limfociták odavonzásában, ezzel párhuzamosan pedig az adott nyirokszerv szerkezetének (T/B-sejt zónák) kialakításában és fenntartásában elengedhetetlenek. (*Honda és tsai, 2001*)

A nyirokcsomókkal ellentétben a bél antimezenterialis oldalán elhelyezkedő PP-okat nem borítja külső tok, limfatikus ereik sincsenek, viszont rendelkeznek a nyirokcsomókra is jellemző HEV-ekkel, melyek a PP-ok esetében MAdCAM-1-et expresszálnak, amely az LTi sejtek $\alpha 4\beta 7$ integrinjéhez képes kötődni. A PP-ok kialakulásához az LTi és LTo sejtek mellett a limfoid szövet iniciátor (LTin) sejtek is szükségesek. (*Finke és tsai, 2001*) A colon plakkok (ColP) szerkezete és kialakulása a PP-éval szinte teljesen azonos. (*Baptista és tsai, 2013*)

A programozott fejlődésű bél-asszociált nyirokszervekkel ellentétben a SILT-ek kialakulása posztnatálisan, a bél mikrobiális kolonizációja által indukált módon megy végbe. A SILT-ek csoportját a kezdetleges szerveződésű, főleg LTi sejteket tartalmazó kriptoplakkok (CP) és az ezekből kialakuló, B-sejt folliculussal rendelkező izolált nyiroktüszők (ILF) alkotják, melyek nem tartalmaznak HEV-eket és elkülönült T-sejt zónát. Az ILF érésében fontos szerepet kap a bél mikrobiomja is. A SILT-eket széles körben vizsgálták állatmodellekben, viszont emberben való megoszlásukról csak kevés adat áll rendelkezésre. (*Lügering és tsai, 2010*)

1.3 ILC sejtek jelentősége és alcsoportjaik jellemzői

Az innate limfoid sejtek (ILC) hematopoetikus őssejtből történő kialakulásához számos transzkripciós faktor közreműködése szükséges. Morfológiájuk a limfoid sejtekével azonos és szelektív kifejeződésű transzkripciós faktorok hatására T-helper típusú citokinek termelésére is képesek, viszont nem rendelkeznek géntrendeződés során létrejövő antigén specifikus receptorokkal.

Az ILC-k számos funkciót látnak el különböző immunológiai folyamatokban, a nyirokszövetek fejlődésétől a mukózális felszínnek homeosztázisának fenntartásán át, a kórokozók elleni védelem, és a gyulladós folyamatok szabályozásáig. (*Spits és tsai, 2016*) Transzkripciós faktor profiljuk és citokin termelő képességük alapján három fő, funkciójukban is eltérő csoportba sorolhatjuk őket: ILC1, ILC2 valamint az nyirokszervek fejlődéséhez elengedhetetlen LTi sejteket magában foglaló ILC3 csoport. Az ILC3 sejtek kettős szerepet töltenek be a gyulladós folyamatokban, mivel IL-22 és IL-17 termelő képességük révén anti-inflammatorikus és pro-inflammatorikus tulajdonsággal egyaránt rendelkeznek. (*Kellermayer és tsai, 2017*)

Bár ezen sejtcsoport vizsgálata egérben és emberben is jelentős fejlődésen ment keresztül az utóbbi időszakban, az egyes alcsoportok elkülönült fejlődése, szövet-specifikus funkcióik, valamint homeosztázisuk számos részlete még megoldatlan. (*Spits és tsai, 2012*)

1.4 Az Nkx2-3 transzkripciós faktor

Az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor fontos szabályozó szerepet tölt be a lép, és a PP-ok fejlődésében, a pLN kialakulásában viszont nincs szerepe. Az Nkx2-3 elengedhetetlen az endotél sejteken való MAdCAM-1 kifejeződéséhez, amely nélkülözhetetlen a mukózális szövetekbe történő limfocita hominghoz, az $\alpha 4\beta 7$ valamint L-selectin leukocita receptorok megkötésén keresztül. (*Mebius és tsai, 1996*)

Az Nkx2-3 faktor hiánya atrófiás rendezetlen szerkezetű lépet, kisebb, kevesebb és eltérő ér-endotél adresszin mintázattal rendelkező Peyer plakkokat, megnagyobbodott és eltérő szerkezetű colon kriptákat, abnormális villus fejlődést, és megváltozott limfocita homingot eredményez. (*Pabst és tsai, 1999*)

Nkx2-3^{-/-} egerekben a PP mukózális HEV-ekben a MAdCAM-1-et PNAd adresszin helyettesíti. (*Kellermayer és tsai, 2014*) a pLN-ek szerkezetében viszont nincs eltérés. (*Pabst és tsai, 2000*) Az Nkx2-3 faktor tehát szövet specifikus módon járul hozzá a GALT érhálózatának és limfocita homingjának kialakításához a MAdCAM-1 expresszió szabályozásán keresztül.

Emberben szintén megfigyelhetjük az Nkx2-3 faktor korlátozott szöveti expresszióját többek között a bélben. Ezzel összefüggésben az Nkx2-3 faktor megváltozott expresszióját kapcsolatba hozták az IBD mindkét formájának kialakulásával. (*Yu és tsai, 2012*) A humán Nkx2-3 faktor szerepét mutatták ki a colorektális miofibroblasztok identitásának fenntartásában is, amely révén valószínűleg a colon őssejt populációjának szabályozásában is szerepe lehet. (*Hsia és tsai, 2016*)

A fenti megfigyelések mellett az Nkx2-3 faktor pontos expresszióját még nem sikerült teljes mértékben meghatározni sem egérben sem pedig emberben, így további kísérletek szükségesek az Nkx2-3-at expresszáló sejtek pontos azonosítására.

2. Célkitűzés

Kutatócsoportunk korábbi munkái során vizsgálta az Nkx2-3 transzkripciós faktor szerepét a lép és Peyer plakkok szerkezetének kialakításában, kiemelt hangsúlyt fektetve az érhálózatra, valamint ezzel párhuzamosan a limfocita recirkuláció és homing folyamatokra.

Eredményeink szerint az Nkx2-3 fontos szerepet játszik a MAdCAM-1 mukózális adresszin expressziójának szabályozásában. Nkx2-3 hiányában az endotél MAdCAM-1 expresszió embrionális korban megtartott, viszont a születést követő első hónapban fokozatosan eltűnik, ellentétben a MAdCAM-1 hiányos egerekkel, melyeknél a MAdCAM-1 teljes hiánya figyelhető meg.

Célunk az Nkx2-3 transzkripciós faktor szerepének vizsgálata volt a lamina propria ILC3 sejteinek megoszlásában, a SILT képződésben, valamint a gyulladósos bélbetegségek lefolyásának szabályozásában.

PhD munkám során Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányos egereken végzett kísérletekkel az alábbi kérdéseket kívántuk megválaszolni:

- *Hogyan változik a lamina propria ILC3 sejtek megoszlása a bélben Nkx2-3 illetve MAdCAM-1 hiányában posztnatális és felnőtt korban?*
- *Milyen hatással van az Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiánya a SILT fejlődésre és megoszlásra posztnatális és felnőtt korban?*
- *Milyen eltérések figyelhetők meg felnőtt Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányos egerekben DSS indukálta colitis lefolyásában, a lamina propria ILC3 sejtek és SILT struktúrák megoszlásában?*
- *Mi befolyásol(hat)ja a DDS indukált colitis eltérő lefolyását Nkx2-3 hiányában?*

3. Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok

Az Nkx2-3^{-/-}, 129SvxB6 kevert háttérű egereket BALB/cJ egerekkel kereszteztük vissza 14 generáción keresztül. Az egerek genotipizálását konvencionális duplex PCR módszerrel végeztük, az Nkx2.3 és neomicin rezisztens gén amplifikálásával. (Pabst és tsai, 1999) A C57BL/6 háttérű MAdCAM-1^{-/-} (Madcam1^{tm1.2Nwag}) egértörzset Angela Schippers és munkatársai állították elő. (Schippers és tsai, 2009) A BALB/cJ és C57BL/6J egereket a Jacksons Laboratory-ból (Bar Harbor, USA) szereztük be. Kísérleteink során a korábban leírt mCD19CherryLuciferáz (CD19CL) transzgenikus egereket (Scotto és tsai, 2012) és LacZ-Nkx2.3^{+/-} riportter egerekből származó mintákat (Wang és tsai, 2000) is felhasználtunk. Az élő állatokkal kapcsolatos valamennyi eljárást a PTE Állatkísérletek Etikai Bizottsága általi iránymutatásoknak megfelelően végeztük.

DSS kezelés

Colitis indukálásához 8-10 hetes egereket 2,5% DSS (AppliChem GmbH) tartalmú vízzel itattuk hét napig. Az egereket akut colitis vizsgálatához a 7. napon, szubakut colitis vizsgálatához pedig a 14. napon áldoztuk fel. Kontrollként alomtársakat használtunk, vagy az aljzatot cseréltük rendszeresen a ketrecek között.

Lamina propria limfocita izolálás és áramlási citometria

A lamina propria limfocitákat egy korábban leírt protokoll alapján izoláltuk. (Sawa és tsai, 2011) A vékonybél és colon szakaszokat külön dolgoztuk fel, az egy és két hetes egerek esetében legalább 3 bélmintát pooloztunk. A mintákat EDTA kezelés és alapos mosást követően, kollagenáz D és DNáz I segítségével disszociáltuk. A mononukleáris sejteket sűrűség gradiens centrifugálással szeparáltuk.

A szeparált sejteken különböző jelölt és jelöletlen antitestekkel sejtfelszíni jelölést végeztünk, majd a jelöletlen antitesteket fluorokróm konjugált másodlagos antitestekkel detektáltuk. Az intracelluláris jelölést a permeabilizációt követően a gyártói protokoll szerint hajtottunk végre.

Méréseinket BD FACSCanto II vagy BD FACSCalibur áramlási citométerrel végeztük. A limfoid kapun belül mintánként legalább ötezer CD45⁺CD3⁺CD19⁻ sejtet gyűjtöttünk össze, majd elemeztünk ki az FCS Express szoftver segítségével.

Szövetten

A SILT struktúrák összetételének meghatározásához colon és vékonybél szakaszokból Swiss-rollokat készítettünk. A blokkokból 4-6, síkban 8µm vastagságú kriosztát metszeteket készítettünk, melyeken acetonos fixálás után többszörös immunfluoreszcenciát végeztünk jelölt és jelöletlen antitestekkel. A jelöletlen antitesteket jelölt másodlagos antitestekkel detektáltuk. A metszeteket glicerines fedést követően Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A reprezentatív képeket az Olympus Fluo-View FV-1000 lézer scanning konfokális képalkotó rendszerrel készítettük.

A DSS-kezelt egerek szövettani értékeléséhez a colon Swiss-roll kriosztát metszetek hematoxin-eozin festését és hisztopatológiai kiértékelését a PTE Patológia Intézetében végezték standard eljárás szerint. (Barthel és tsai, 2003).

B-sejt-kolónia analízis teljes vastagbél biolumineszcenciával

A B-sejtek globális bél-megoszlásának vizsgálatára Nkx2-3^{-/-} egérrel keresztezett mCD19CherryLuciferáz (CD19CL) transzgenikus egereket használtunk. Az egerek elaltattuk, majd D-luciferinnel oltottuk. 10 perc múlva az egereket feláldoztuk, colonjukat pedig az IVIS

Lumina II képkalkító rendszerrel elemeztük. Az adatok kiértékelése a Living Image szoftverrel, a releváns tartományok (ROI) meghatározása egyedi lumineszcencia küszöbértékük alapján történt.

Immunizálás és ELISA

Az anti-ovalbumin válasz indukálásához az egereket 50 μ l 50mg/ml OVA-val Freund's adjuváns hozzáadásával immunizáltuk. Az oltások a nulladik és hetedik napon a bal talppárnába, szubkután történtek. Az egereket a 21. napon szérum gyűjtés céljából dolgoztuk fel. Az anti-OVA IgG válasz meghatározására ELISA tesztet végeztünk, PO-konjugált anti-egér IgG felhasználásával. A peroxidáz aktivitást citrát-foszfát pufferben ortho-feniléndiaminnal és H₂O₂-al detektáltuk. A mintákat duplikátumokban, 492 nm-en mértük le.

RNS izolálás, cDNS írás, RT-PCR

A teljes RNS izolálása a NucleoSpin RNA (macherey-Nagel GmbH) RNS izoláló kit-el történt. cDNSt a High Capacity cDNA RT Kit segítségével szintetizáltunk. A PCR reakciót ABI-PRISM 7500 géppel duplikátumokban futtatuk SYBR green primerekkel (*Czömpöly és tsai, 2011*), vagy TaqMan próbákkal. Az eredményeket a β -actin, vagy az mGAPDH housekeeping gének százalékaként tüntettük fel.

Szérum IL-22 mérés

A szérum IL-22 mérése Mouse/Rat IL-22 Quantikine ELISA kit-el (R&D Systems) történt, a gyártói protokoll alapján. A koncentrációkat standard görbe alapján határoztuk meg.

Anti-IL-22 kezelés

Nkx2-3^{-/-} egereket 2,5% DSS tartalmú vízzel itattunk 7 napig. A 2., 3., 4., 5., és 6. napon az egereket 150 μ g anti-IL-22 monoklonális antitesttel, vagy izotípus kontrollal intraperitoneálisan oltottuk. Az egereket a hetedik napon dolgoztuk fel, colonjaikat szövettani és áramlási citometriás analízisre használtuk fel.

3.12 Csontvelő kimérák előállítás

A négy hetes eGFP-tgBALB/c egereket a PTE Onkoterápiás Intézetében 2 x 5,5 Gy letális dózissal sugaraztuk be Co⁶⁰ forrásból, 6 órás intervallumokban. Az egerek ezt követően 5 x 10⁶ csontvelő sejtet kaptak BALB/c vagy Nkx2-3^{-/-} egerekből 3 órával a második besugárzást követően, farokvénába történő oltással. A kimérizmus mértékét PBMC eGFP/CD45 expressziója alapján határoztuk meg.

3.13 Kombinált LacZ/ β -galaktozidáz enzim és immunhisztokémia

A LacZ-Nkx2-3 riporter (*Wang és tsai, 2000*) és BALB/c egerek vastagbeléből készült Swiss-roll kriosztát metszeteket aceton-fixálását követően különböző epitél, fibroblaszt, vagy endotél markerekre jelöltük patkány monoklonális antitestekkel. Az antitesteket ImmPRESS-HRP kecske anti-patkány IgG kit-el detektáltuk. Mosást követően a mintákat X-gal tartalmú szubsztrát oldatban egy éjszakán át inkubáltuk 37°C-on.

3.14 Statisztikai analízis

Adatainak az IBM® SPSS® Statisztikai szoftverrel (22-es verzió) elemeztük ki. A nem normál eloszlású csoportokat Mann-Whitney teszttel elemeztük ki. Az adatokat átlag \pm SEM-ként tüntettük fel. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0.05$ értékeket tekintettük.

4. Eredmények

4.1 Posztnatális lamina propria ILC3 megoszlás Nkx2-3 hiányában

Az Nkx2-3 transzkripciós faktor hiánya gátolja a MAdCAM-1 adresszin endoteliális kifejeződését, viszont a MAdCAM-1^{-/-} egerekkel ellentétben, ahol a MAdCAM-1 teljes hiánya figyelhető meg, Nkx2-3^{-/-} egerekben az endotél MAdCAM-1 expresszió a születés utáni első hetekben fokozatosan szűnik meg. Munkánk során a két eltérő jellegű MAdCAM-1 hiány a béltraktus posztnatális ILC3 sejtmegoszlásra kifejtett hatását szeretnénk volna meghatározni. Az 1, 2 és 4 hetes egerekből izolált lamina propria sejtekből áramlási citometriával azonosítottuk a CD45⁺CD3⁻CD19⁻CD90⁺RORγt⁺ ILC3 sejteket.

Az ILC3 sejtek abszolút száma a vékonybélben (siILC3) minden vizsgált egértörzsben magasabb volt, mint a colonban minden vizsgált időpontban.

A vékonybélben az első posztnatális héten volt a legmagasabb az ILC3 sejtek száma. A második hétre mindegyik vizsgált egértörzsben jelentősen csökkent az siILC3 szám. A negyedik hétre a C57BL/6 egerek kivételével, ahol az siILC3 szám kis mértékben emelkedett, minden törzsben további csökkenést figyelhettünk meg. Ebben az időpontban Nkx2-3^{-/-} egerekben szignifikánsan alacsonyabb siILC3 számot figyeltünk meg, Nkx2-3^{+/-} társaikhoz viszonyítva.

Érdekes módon a MAdCAM-1 hiányos egerekben volt az ILC3 sejtek száma a legalacsonyabb minden vizsgált időpontban, ráadásul ez az alacsony sejtszám folyamatos csökkenést is mutatott, nem csak a vékonybélben, hanem a colonban is.

Az első héten a colonban a MAdCAM-1^{-/-} egerekben az cILC3 sejtek abszolút száma csak a harmada volt a többi törzsben megfigyeltekhez képest. A negyedik hétre az Nkx2-3 deficiens és heterozigóta egerekben is jelentősen csökkent a cILC3 szám. A vékonybéllel ellentétben ahol az siILC3 szám szignifikánsan alacsonyabb volt Nkx2-3 hiányában, a colonban magasabb ILC3 szintet detektáltunk, ezzel ellentétben MAdCAM-1^{-/-} egerekben a cILC3 szám a negyedik hétre minimálisra csökkent.

Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a MAdCAM-1 hiány eltérő formái különböző módon befolyásolják az ILC3 sejtek megoszlását a béltraktus különböző szakaszaiban. A kontrollhoz képest a legsúlyosabb eltérést pedig az általános MAdCAM-1 hiány következtében a MAdCAM-1^{-/-} egerekben figyelhettük meg.

4.2 A posztnatális SILT-érés kinetikája Nkx2-3 hiányában

Kutatócsoportunk korábbi munkája során megállapította, hogy Nkx2-3 hiányában a limfociták megoszlásának zavara a PP-ok megváltozott vaszkuláris mintázatával társul, amely fiatal felnőtt egerekben a MAdCAM-1 adresszin fokozatos PAd-re váltásával magyarázható. (Kellermayer és tsai, 2014) Jelenlegi munkánkban ezért azt szeretnénk volna vizsgálni, hogy ez a megváltozott adresszin mintázat hogyan befolyásolja a SILT képződést. Ehhez a SILT-ek különböző fejlődési fázisait hasonlítottuk össze Nkx2-3 illetve MAdCAM-1 hiányos, valamint kontroll egerek colonjában. Az azonos környezeti feltételek biztosítására Nkx2-3^{-/-} egerek esetében kontrollként Nkx2-3 heterozigótákat használtunk. A különböző SILT struktúrákat immunfluoreszcenciával azonosítottuk.

Az első posztnatális héten minden vizsgált egértörzsben csak CP-ok és imILF-ek voltak megfigyelhetők, melyek aránya Nkx2-3^{-/-} és MAdCAM-1^{-/-} egerekben is a kontroll csoportjaikban megfigyeltekhez hasonló megoszlást mutatott. Érdekes módon a C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} egerekben a CP-ok aránya magasabb volt

A második héten a MAdCAM-1^{-/-} egerek kivételével minden törzsben megjelentek a matILF-ek, viszont arányuk Nkx2-3 hiányában jóval alacsonyabbnak bizonyult.

A születés utáni negyedik hétre MAdCAM-1^{-/-} egerekben is megjelentek a matILF-ek, viszont arányuk szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll C57BL/6 csoporthoz viszonyítva. Nkx2-3

deficiens egerekben is alacsonyabb matILF arányt figyeltünk meg az Nkx2-3 heterozigótákhoz képest, viszont ez az eltérés nem bizonyult szignifikánsnak.

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a MAdCAM-1 hiány eltérő formái (Nkx2-3^{-/-} esetén transzkripcionális, MAdCAM-1^{-/-} esetén genomális) különböző módon befolyásolják a SILT fejlődést a colonban. Nkx2-3 hiányában a SILT érés csak kis mértékben mutatott eltérést a kontroll csoporthoz képest, viszont globális MAdCAM-1 hiányában sokkal jelentősebb változások történtek. MAdCAM-1^{-/-} egerekben ugyan megjelent az LT_i sejteket tartalmazó CP formáció, ugyanakkor a további SILT érés jelentős késést mutatott. Ennek ellenére a MAdCAM-1 mukozális adresszin általános hiánya sem tudta teljesen megakadályozni a SILT-ek kialakulását és fejlődését a colonban. A legszembetűnőbb eltérést a második héten figyeltük meg, amikor Nkx2-3^{-/-} egerekben, (a kontroll csoporthoz képest kisebb arányban ugyan), már megjelentek matILF-ek, ezzel szemben MAdCAM-1^{-/-} egereknél csak később, a negyedik héten láttunk matILF-eket, akkor is csak igen alacsony számban.

4.3 Posztnatális ILC3 megoszlás és vaszkuláris adresszin expresszió kapcsolata a bélben

A következőkben az ILC3 megoszlás eltéréseinek a MAdCAM-1 és PNAd adresszinek eltérő expressziójával való korrelációját vizsgáltuk. Ehhez Nkx2-3^{-/-} egerek MAdCAM-1 expresszióját és MAdCAM-1^{-/-} egerek PNAd expresszióját kvantitatív immunfluoreszcenciával és ImageJ analízissel elemeztük.

A vékonybélben Nkx2-3^{-/-} egerekben a MAdCAM-1 magasabb expressziós szintjét figyeltük meg egy hetes egerekben, viszont a negyedik hétre a MAdCAM-1 expresszió szingifikánsan alacsonyabb szintre csökkent az Nkx2-3^{+/-} csoporthoz viszonyítva. Ezzel ellentétben a colonban Nkx2-3 hiányában a MAdCAM-1 expresszió minden vizsgált időpontban alacsonyabb volt a heterozigótákban mért értékeknél. Ebből arra következtethetünk, hogy a két bélszakaszban eltérő kinetikát mutat a MAdCAM-1 expresszió fokozatos eltűnése, továbbá a MAdCAM-1 expresszió változása nem mutatott kapcsolatot az ILC3 sejtek helyi megoszlásában megfigyelt eltérésekkel.

A MAdCAM-1^{-/-} egerek vékonybelében a PNAd expresszió az első két héten a kontroll C57BL/6 csoporté alatt maradt, viszont a negyedik hétre a PNAd expresszió meghaladta a kontroll csoportban mért értéket. Az ILC3 sejtek száma a C57BL/6 egerek vékonybelében viszonylag stabilnak bizonyult, viszont a PNAd szint fokozatosan emelkedett. A MAdCAM-1^{-/-} egerekben ezzel ellentétben az siILC3 sejtek száma szignifikánsan csökkent az idő előrehaladtával, a PNAd expresszió emelkedése mellett. A colon PNAd expressziója MAdCAM-1^{-/-} egerekben már a második hétre szignifikáns növekedést mutatott a kontroll csoporthoz képest, mely tovább emelkedett a negyedik hétig. Ezzel ellentétben a cILC3 szám MAdCAM-1 hiányos és vad típusú egerekben is fokozatosan csökkent, ráadásul MAdCAM-1 hiányában az ILC3 sejtek csak alig észlelhető számban voltak jelen.

4.4 PNAd core protein és módosító enzim mRNS expresszió eltérései Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányában

A MAdCAM-1 adresszin biztosítja a limfociták PP-okba és bélbe történő homingját. Nkx2-3 hiányában az endotél sejtek nem expresszálnak MAdCAM-1-et, viszont a PP-okban számos PNAd core fehérje és módosító enzim mRNS szintje megemelkedik. (*Kellermayer és tsai, 2014*) Az Nkx2-3 deficiens egerekben megállapítottakat követően arra voltunk kíváncsiak, hogy MAdCAM-1^{-/-} egerekben is hasonló eltéréseket találunk-e. MAdCAM-1 hiány esetén az endomucin és podocalyxin-szerű PNAd core mRNS szignifikáns növekedését tapasztaltuk a vad típusú kontrollhoz viszonyítva. Az előzők mellett a CD34 mRNS szintén emelkedett, bár nem szignifikáns mértékben, a Glycam1 és nepmucin expressziós szintje viszont nem változott a kontrollhoz képest.

A MECA-79 antitest által felismert PNAd glikoepitóp létrehozásában fontos módosító enzimek közül a bétaGal béta-1,3-N-acetyl glükózaminil transzferáz 3 szulfotranszferáz (B3gnt3) és alfa-(1,3)-fukozil transzferáz (Fut7) mRNS-ek nem mutattak szignifikáns eltérést, viszont az N-acetilglükózamin 6-O szulfotranszferáz (Chst4) mRNS szinten szignifikánsan emelkedett MAdCAM-1 hiányos egerek PP-jaiban. Ezek az eltérések különböznek a korábban Nkx2-3 hiányos egerekben megfigyeltektől, ahol a legszembetűnőbb eltérés a Glycam1 mRNS expresszióban volt megfigyelhető, de a Chst4 is szignifikáns növekedést mutatott. (Kellermayer és tsai, 2014)

4.5 Megtartott perifériás nyirokcsomó szerkezet és normál T-dependens antitest válasz Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányában

A perifériás nyirokcsomók (pLN) HEV-jei az embrionális fejlődés és korai posztnatális érés során MAdCAM-1 adresszint expresszálnak; azonban ezen molekula szerepe a nyirokcsomókba történő posztnatális limfocita megtelepedésben egyelőre ismeretlen. (Mebius és tsai, 2003) Ennek kapcsán az Nkx2-3 és MAdCAM-1 különböző fokú hiányának a pLN kialakulására és szerkezeti érésére gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az immunhisztológiai vizsgálat során sem a limfoid kompartmentalizációban sem pedig a folliculáris strómális szerveződésben nem találtunk eltéréseket.

Ezt követően a helyi T-dependens immunválasz eltéréseit vizsgáltuk Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányos egerekben ovalbuminnal történő immunizálást követő indirekt ELISA teszttel. Eredményeink alapján a MAdCAM-1 hiány sem a MAdCAM-1^{-/-}, sem pedig az Nkx2-3^{-/-} egerekben nem okozott szignifikánsan alacsonyabb antitest szinteket a releváns kontroll csoportokhoz viszonyítva.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a pLN normál szerkezete mellett, a MAdCAM-1 hiánya ellenére is megtartott a T-dependens antitest válasz.

4.6 Nkx2-3 hiányában a SILT érés részlegesen gátolt felnőtt korban

A SILT összetételt fiatal felnőtt egerekben is vizsgáltuk Nkx2-3 hiányában, colon metszetek immunfluoreszcens jelölésével. Nkx2-3^{-/-} egérben a PP-okhoz hasonlóan a ColP-ok erein is megfigyelhető volt a MAdCAM-1 expresszió hiánya és a PNAd luminális megjelenése. BALB/c egerekben a PNAd ezzel szemben csak a HEV-ek abluminális oldalán volt jelen. Ezt követően a B-sejtes klaszterek megoszlását a teljes colonban vizsgáltuk Nkx2-3^{-/-} x mCD19Luc⁺ egerekben. Az *ex vivo* kísérlet során szignifikánsan alacsonyabb számú B-sejtes klaszter volt megfigyelhető, azonban ezek területe szignifikánsan nagyobbak bizonyultak, mint heterozigóta (Nkx2-3^{+/-} x mCD19Luc⁺) társaikban.

Nkx2-3 hiányában normál struktúrájú SILT-eket találtunk a colonban, viszont az éretlen formák nagyobb arányban voltak jelen, mint a kontroll csoportban, tehát Nkx2-3 hiányában a CP-ok kialakulása normál módon végbemegy, viszont további érésük részlegesen gátolt.

Annak megállapítására, hogy Nkx2-3^{-/-} hiányában az endotél MAdCAM-1 hiánya önmagában okozza-e a SILT érés zavarát, a SILT megoszlást MAdCAM-1 hiányos egerekben is vizsgáltuk, melyekben az Nkx2-3 aktivitás megtartott. MAdCAM-1^{-/-} hiányában szintén megfigyeltük a PNAd luminális megjelenését a ColP HEV-eken. MAdCAM-1^{-/-} egerekben a SILT-ek szerkezeti elváltozást nem mutattak, viszont a CP-ok imILF és matILF fázisokba történő érésének sokkal nagyobb mértékű gátlását figyeltük meg.

Áramlási citometriás mérések alapján a SILT asszociált B-sejtek száma MAdCAM-1^{-/-} egerekben volt a legalacsonyabb, ami megváltozott limfocita megoszlást és az Nkx2-3^{-/-} törzsben megfigyelteknél kifejezettebb ILF-érés gátlást eredményezett.

4.7 Felnőttkori colon ILC3 megoszlás Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányában normál és gyulladásoos körülmények között.

Nkx2-3 hiányában a ROR γ ⁺ ILC3 sejtek száma minden vizsgált időpontban (a DSS kezelést megelőzően, akut és szubakut colitisben) magasabb volt a colonban mint vad típusú BALB/c egerekben. Az ILC3 sejtek megoszlását MAdCAM-1^{-/-} egerekben is vizsgáltuk annak megállapítására, hogy a MAdCAM-1 endotél hiánya felelős-e megváltozott arányukért. A vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy MAdCAM-1^{-/-} egerekben DSS kezelés hatására emelkedett az ILC3 sejtek aránya, a 14. napra pedig szignifikánsan magasabb lett a számuk a vad típusú C57BL/6 kontrollokban mértékhez képest.

4.8 Nkx2-3 hiányos egerek védettek a DSS indukálta colitis-el szemben

Korábbi megfigyelések alapján a colitis kialakulása előidézheti a CP-ok matILF-é érését, (Lochner és tsai, 2011; Olivier és tsai, 2016) ezért DSS-indukálta colitis egérmodellben is vizsgáltuk a SILT megoszlást a colonban. A 7. (akut colitis) és a 14. (szubakut colitis) napon vizsgáltuk a bélmintákat. Érdekes módon az Nkx2-3 hiányos egerek bizonyos fokú védettséget élveztek DSS indukálta colitisszel szemben számos fiziológiai paraméter alapján. A kontroll csoporthoz képest így Nkx2-3^{-/-} egereknél a DSS kezelés alatt csak minimális súlycsökkenést figyeltünk meg, rektális vérzést is csak néhány egyednél tapasztaltunk, emellett a colon rövidülése minimális, a túlélési arány pedig 100%-os volt. A hematoxin-eozin festett colon metszetek szövettani kiértékelése során Nkx2-3 hiányában alacsonyabb patológiai érték volt megállapítható, mint vad típusú (BALB/c) társaik esetében. Annak vizsgálatára, hogy Nkx2-3^{-/-} egerekben az endotél MAdCAM-1 hiánya okozza-e a DSS indukálta colitisszel szembeni védelmet, kísérleteinek MAdCAM-1^{-/-} egereken is elvégeztük. Meglepő módon a MAdCAM-1 deficiens egértörzsben viszont még a vad típusnál is súlyosabb gyulladás alakult ki DSS kezelés hatására.

Vad típusú kontroll egerekben DSS kezelés hatására emelkedett az érett SILT struktúrák száma, ezzel ellentétben Nkx2-3 hiányában késleltetett SILT érés volt megfigyelhető. MAdCAM-1^{-/-} egereknél a SILT érés még kifejezettebb gátlását figyeltük meg, mivel a B-sejteket tartalmazó SILT-ek aránya csak a 14. napra emelkedett ebben a csoportban.

A B-sejtek számának eltérő kinetikájú növekedését áramlási citometriával is igazoltuk. Az Nkx2-3 és MAdCAM-1 deficiens egerek colonjában a kezelés teljes időtartama alatt alacsonyabb volt a B-sejtek száma, mint a kontrollokban.

Nkx2-3^{-/-} és MAdCAM-1^{-/-} egerekben a MAdCAM-1 különböző típusú hiánya és az ennek következtében kialakult eltérő adresszin expresszió a colon-ereken magyarázatot adhat a késleltetett SILT érésre; DSS kezelés hatására viszont csak az Nkx2-3^{-/-} egerekben nem alakult ki gyulladás, így a colitis elleni védettség kialakulása nem magyarázható az endotél MAdCAM-1 hiányával.

4.9 Nkx2-3 hiányában a bélgyulladással szembeni védettség IL-22 független

Korábbi kutatások során kimutatták, hogy az ILC3 sejtek által is termelt IL-22 képes indukálni a mukózális regenerációban fontos szerepet betöltő Reg fehérjék és mucinok termelését, ami így fontos szerepet játszhat a colitisszel szembeni védelemben. (Zheng és tsai, 2008; Pichert és tsai, 2009) Kutatócsoportunk az IL-22, RegIII β és RegIII γ mRNS emelkedett szintjét figyelte meg akut colitis során Nkx2-3^{-/-} egerek colonjában. MAdCAM-1^{-/-} egerek esetében viszont nem találtunk szignifikáns eltérést az IL-22 mRNS expresszióban DSS-indukált colitis akut szakaszában. A colitis 14. napjára az IL-22 szint Nkx2-3^{-/-}, és MAdCAM-1^{-/-} egerek colonjában is szignifikánsan alacsonyabb volt a releváns vad típusú kontrollokhoz képest.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy Nkx2-3 hiányos egerekben az emelkedett IL-22 szint okozhatja-e a colitisszel szembeni védettséget. Kezeletlen Nkx2-3 hiányos és vad típusú

egerek IL-22 szérumban szintjében nem találtunk eltérést, viszont a DSS kezelés során az IL-22 szérumban szintje szignifikánsan alacsonyabb volt Nkx2-3 hiányában. Ezek alapján az Nkx2-3-deficiens egér az IL-22 szint növekedés elmaradása ellenére is védett volt a colitisszel szemben, ugyanakkor a BALB/c egerekben az IL-22 szint növekedése ellenére is súlyos colitis alakult ki.

Az IL-22 szerepének további vizsgálatához Nkx2-3^{-/-} egereket antagonistá anti-IL-22 antitesttel vagy izotípus-kontroll antitesttel kezeltünk a DSS kezelés során. Érdekes módon, az Nkx2-3 hiányos egerekben továbbra sem figyeltünk meg súlyosabb colitisre utaló jeleket sem makroszkóposan, sem pedig a szövettani értékelés során, valamint a SILT összetételben és az ILC3 megoszlásban sem történt szignifikáns változás.

Mindezek ellenére a RegIII β és RegIII γ mRNS szintjei jelentősen csökkentek anti-IL-22 kezelt egerekben, amely a kezelés biológiai hatásosságát mutatta. Eredményeik alapján megállapítottuk, hogy az IL-22 gátlása nem vezet colitis indukcióhoz Nkx2-3 hiányában, viszont a mukózális regenerációban fontos Reg fehérjék szintjének csökkenését okozza, ugyanakkor ezen utóbbiak csökkenése sem okoz colitist.

4.10 Nkx2-3 hiányában nem-hematopoetikus sejtek révén alakul ki a colitis elleni védettség

Következő kísérletünkben arra voltunk kíváncsiak, hogy Nkx2-3 hiányában a vérképző vagy a nem-hematopoetikus stróma sejteknek köszönhetően alakul-e ki védettség a gyulladással szemben. Ehhez csontvelő kimérákat hoztunk létre az anyagok és módszerekben leírtak szerint. 5 héttel a sejt-transzplantáció után a legalább 90%-os kimérizmust mutató egereket 7 napig 2,5% DSS tartalmú ivóvízzel itattuk, majd az egereket a 7. napon feldolgoztuk. A két csoport között (Nkx2-3^{-/-} csontvelővel vagy BALB/c csontvelővel transzplantált eGFP-Tg-BALB/c recipiens egerek) sem súlyvesztésben, sem a colitis súlyosságában nem tapasztaltunk különbséget, mindkét csoport érzékeny volt a colitis kiváltására. Ebből arra következettünk, hogy az Nkx2-3 faktor hiányában nem a hematopoetikus, hanem a strómasejtek gátolják a colitis kialakulását.

Az Nkx2-3 fehérjét kifejező nem-hematopoetikus strómasejtek azonosítására LacZ-Nkx2-3^{+/-} riportert egereket használtunk. Immunhisztokémia és X-gal festés kombinációjával megállapítottuk, hogy sem az epitél sem pedig az endotél sejtek nem expresszálnak Nkx2-3-at, viszont a miofibroblaszt-szerű VAP-1 pozitív sejtek a bélfal tunica-muscularis-mukóza rétegében igen. Ez a megfigyelés összeegyeztethető a nemrég publikált humán eredményekkel is. (Hsia és tsai, 2016)

5. Megbeszélés

Az IBD napjaink egyik leggyakrabban előforduló krónikus gyulladós kórképe, melynek kialakulásához a mikrobióta elleni rendellenes immunológiai válaszkészség és bakteriális diszbiózis mellett számos környezeti és genetikai faktor is hozzájárulhat. Ezek egyike az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor, amely Crohn betegségben és colitis ulcerosa-ban egyaránt hajlamosító szerepet játszhat.

Az ILC3 sejtek számos immunológiai folyamatot szabályoznak, részt vesznek a mukózális limfoid szövetek kialakításában, valamint az epitél regenerációban IBD-ben. A gyulladós bélbetegségek egyik jellemzője az ektópiás nyirokszöveti neogenezis, melyben az ILC3 sejtek szintén fontos szerepet töltenek be. (*Geremia és tsai, 2017*).

Ahhoz, hogy az ILC3 sejtek helyileg érvényesíthessék hatásait, a bélbe kell migrálniuk. Ehhez a mukózális HEV-eken és a lamina propria ereken található MAdCAM-1 adresszinhez kell kapcsolódniuk az $\alpha 4\beta 7$ integrinjükön keresztül. Az Nkx2-3 faktor a MAdCAM-1 expresszió szabályozásán keresztül tehát befolyásolhatja az ILC3 sejtek megoszlását valamint a bél-asszociált nyirokszövetek fejlődésében és az IBD patomechanizmusában játszott helyi szerepük érvényesülését.

Munkánk során Nkx2-3 hiányos egereket vizsgáltunk, melyekben az első posztnatális hónap során az endotél MAdCAM-1 expresszió fokozatosan megszűnik, helyette PNA-d jelenik meg, a nem-endotél MAdCAM-1 expresszió (pl. FDC felszínen) viszont megtartott, hasonlóan a perifériás nyirokcsomókhoz. (*Mebius és tsai, 1996; Hamada és tsai, 2002*) Az Nkx2-3 deficiens egerekkel szemben a MAdCAM-1 génkiütött egereket általános MAdCAM-1 hiány (*Schippers és tsai, 2009*), valamint emelkedett PNA-d expresszió jellemzi, így a két egérmodell vizsgálata kiegészítő módon segítheti a MAdCAM-1 adresszin és az intesztinális limfoid megtelepedés IBD-ben játszott szerepének jobb megértését.

Az ILC3 sejtek posztnatális megoszlását különböző bélszakaszokban vizsgáltuk. Eredményeink szerint a vékonybél sokkal nagyobb számban tartalmazott ILC3 sejteket, mint a colon. Egy hetes korban nem találtunk különbséget Nkx2-3^{-/-} és Nkx2-3^{+/-} egerek ILC3 megoszlásában, ami arra utal, hogy az ILC3 sejtek mukózális megtelepedése a vékonybélben hatékonyan végbemegy. Az első héttel ellentétben, a posztnatális időszak későbbi időpontjaiban az Nkx2-3^{-/-} egerekben alacsonyabb abszolút ILC3 értékeket mértünk a vékonybélben, és az érett ILF-ek száma is jelentősen alacsonyabbnak bizonyult, melyek a MAdCAM-1 adresszin fokozatos eltűnésével hozhatók összefüggésbe.

A colon ILC3 megoszlása a vékonybélben megfigyeltékhez képest jelentős eltérést mutatott. Ennek az lehet az oka, hogy a vékonybélben eltérő faktorok biztosítják az ILF-ek kialakulását, valamint alternatív adresszin(ek) részlegesen is kompenzálhatja(k) a MAdCAM-1 hiányát. (*Knoop és tsai, 2011*)

A colonban található ILF-ek megoszlásában megfigyelt eltéréseket több tényező okozhatja. Az egyik a korábban leírt késleltetett ILF érés a C57BL/6 típusú egerekben, melyet az általunk megfigyelt, a BALB/c háttérű egerekhez viszonyított CP/ILF arány eltolódás is alátámaszt. A CP kialakuláshoz képest az imILF-é majd matILF-é érés folyamata a vékonybélben korábban leírtakhoz hasonlóan a colonban is késleltetett. (*Ibiza és tsai, 2016*) Érdekes módon MAdCAM-1^{-/-} egerekben a C57BL/6 törzsben megfigyeltékhez hasonlóan alakultak a CP/ILF arányok, amely szintén a CP-ILF átalakulás MAdCAM-1 függetlenségét bizonyíthatja. (*Garcia-Barcelo és tsai, 2007*) Ezzel szemben MAdCAM-1 hiányában az ILF további érése (valószínűleg a B-sejt dependens fázisban) nagymértékben gátolt. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy MAdCAM-1 hiányában a PNA-d adresszin emelkedett expressziója sem képes a MAdCAM-1 szerepét pótolni, az Nkx2-3^{-/-} egerekben pedig a korai posztnatális időszakban részlegesen megtartott MAdCAM-1 expresszió miatt kevésbé súlyos az ILF érés gátlása.

Munkánk során vizsgáltuk a különböző MAdCAM-1 hiányok immunválaszra gyakorolt hatását perifériás nyirokcsomókban is, mivel az $\alpha 4\beta 7$ integrin–MAdCAM-1 kölcsönhatás nem csak a PP-ok, hanem a perifériás nyirokcsomók kialakulásában is szerepet játszik embrionális korban. (Mebius és tsai, 1996) Megfigyelésünk alapján a MAdCAM-1^{-/-} egerekben ugyan a PP-ok kialakulása és az ILF-ek érése is részlegesen gátolt, a pLN-ek viszont sem szerkezeti felépítésükben, sem pedig funkciójukban nem mutattak eltérést. Ebből arra következtettünk, hogy a pLN-ekben más endotél ligandok által juthatnak el az ILC3/LTi sejtek a nyirokcsomó előtelepbe. Az ILC3 sejtek megtelepedésének részleges megtartása a mukózális felszíneken (az intesztinális limfoid neogenezis fenntartására) illetve az LTi sejteknek az embrionális korban a nyirokcsomó előtelepbe a MAdCAM-1 teljes hiányában történő vándorlása is az endotél adresszin profil plaszticitását mutatja. Ez a plaszticitás megkérdőjelezi az anti-adhéziós terápiás beavatkozások hatékonyságát IBD-ben. Az továbbra is kérdéses, hogy Nkx2-3 illetve MAdCAM-1 hiányában a megváltozott vaszkuláris adresszin mintázat mellett hogyan jutnak el az ILC sejtek és más leukociták a fejlődő nyirokcsomókba, valamint az olyan mukózális területekre, mint a béltraktus. Felvetődik más eddig ismeretlen adresszinek szerepe ebben a folyamatban, amelyek akár lehetséges célpontok is lehetnek a gyulladásos bélbetegségek kezelésében.

A posztnatális időszak első négy hetében a C57BL/6 alapú egértörzsekben késleltetett SILT érést tapasztaltunk a BALB/c típusú egerekhez képest, viszont ez a különbség fiatal felnőtt egerek esetében már nem volt megfigyelhető. Ebben a korban az Nkx2-3^{-/-} egerek endotél MAdCAM-1 expressziója már eltűnik. DSS kezelés hatására Nkx2-3 hiányos egerekben az érett SILT struktúrák aránya megemelkedett, colitis azonban nem alakult ki. Ezzel ellentétben MAdCAM-1^{-/-} egerekben a DSS kezelés igen súlyos colitist eredményezett, a CP-ok viszont csak igen alacsony arányban alakultak át ILF-é. A két törzs között megfigyelt különbségekből arra következtettünk, hogy Nkx2-3 deficiens egerekben nem önmagában a MAdCAM-1 endotél hiánya miatt tér el a felnőttkori SILT fejlődés és alakul ki védettséggel szemben.

A mukózális endotél-sejtek plaszticitását jelzően megjelent PNA core proteinek és glikozilációs enzimek mRNS szintű expressziójának vizsgálata során is jelentős különbségeket figyeltünk meg a két KO egértörzs között. Ezek az eredmények tehát azt mutatják, hogy a két különböző fokú MAdCAM-1 hiányban szenvedő egértörzsben a PNA expressziós szintjének növekedése általi kompenzáció, különböző mRNS expressziós mintázat révén valósul meg. Ez a megváltozott PNA core protein és glikozilációs enzim mRNS expresszió mindkét törzsben lehetővé teszi a MECA-79 szulfatált szénhidrát-függő epitóp megjelenését. Az észlelt változások ellenére korábbi kutatások eredményével (Hamada és tsai, 2002) megegyezően azt figyeltük meg, hogy a CP-ok és imILF-ek megjelenése független a MAdCAM-1/ $\alpha 4\beta 7$ kölcsönhatástól. Kérdéses azonban, hogy az Nkx2-3^{-/-} PP-okban a kutatócsoportunk által korábban megfigyeltekhez hasonlóan a MAdCAM-1/ $\alpha 4\beta 7$ függő homing mechanizmus L-selectin/PNA váltása valósul-e meg MAdCAM-1^{-/-} egerekben is. (Kellermayer és tsai, 2014) Ennek eldöntésére MEL-14 antitesttel végzett kompetitív limfocita-transzfer-kísérlet adhat választ.

Nkx2-3 hiányában a colitis ellen fellépő védettség mellett megfigyeltük a ROR γ ⁺ ILC3 sejtek felszaporodását a colonban, melyek korábbi kutatások alapján képesek protektív IL-22 termelésére DSS indukálta colitisben. (Ibiza és tsai, 2016) Ennek ellenére Nkx2-3^{-/-} egerekben az antagonista anti-IL-22 antitest kezelés hatására sem alakult ki gyulladás, illetve a BALB/c egerekben az emelkedett IL-22 szint sem jelentett védelmet, tehát a DSS-kezeléssel kiváltott colitisszel szembeni védelem nem IL-22 mediált folyamat. Ezen kívül az Nkx2-3 faktor a neurális-rendszer szabályozásban is szerepet játszik ezért azt is feltételezhetjük, hogy hiányában az enterális ideghálózat eltérése is hozzájárulhat a colitisszel szembeni védettséghez. (Garcia-Barcelo és tsai, 2007)

A DSS kezelés hatását csontvelő kimérákon is vizsgáltuk. A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy az irradiált, majd Nkx2-3^{-/-} vagy BALB/c csontvelővel oltott vad típusú egerek között nem volt különbség a DSS indukálta colitis súlyosságában, tehát a vad típusú recipiensekben a normál hematopoetikus sejtek Nkx2-3 hiányos sejtekkel való helyettesítése nem akadályozta meg a colitis kialakulását. Az inverz kísérlet (irradiált Nkx2-3 egerek vad típusú csontvelővel történő rekonstrukciója) az ismételt próbálkozásaink ellenére sikertelennek bizonyult, feltehetően az Nkx2-3 egerek defektív lép vörös pulpa szerkezete miatt, ami a poszt-irradiációs hematopoetikus regenerációban fontos kiegészítő szerepet játszhat.

Az Nkx2-3 kifejeződést mutató strómasejtek azonosítására irányuló kutatásaink igazolták az Nkx2-3 faktor expresszióját VAP-1⁺ miofibroblasztokban. Mindezen eredmények arra engednek következtetni, hogy az ILC3 sejtek megoszlását, valamint az Nkx2-3 hiányában fellépő colitisszel szembeni védettséget nem-hematopoetikus összetvők határozzák meg, tehát az Nkx2-3 faktor bélgyulladásban betöltött szerepe a strómasejtek révén érvényesül. Eredményeink alapján azt is feltételezzük, hogy felnőtt Nkx2-3^{-/-} és MAdCAM-1^{-/-} egerekben az éretlen SILT struktúrák magasabb arányát az endotél MAdCAM-1 hiánya okozza, viszont a DSS kezelés során csak Nkx2-3 egerekben nem alakult ki gyulladás, így a colitisszel szembeni védettség MAdCAM-1 független. Így elképzelhető, hogy Nkx2-3 hiányában, az epitel sérülést követően az Nkx2-3 hiányos strómasejtek biztosítanak egy protektív mikrokörnyezetet, amely IL-22 független módon indukálja a mukóza regenerálódását. Még kérdéses azonban, hogy pontosan milyen funkciójú és fenotípusú sejtek vesznek részt ebben a folyamatban. Ezek a sejtek és az Nkx2-3 faktort által szabályozott jelátviteli útvonalaiak potenciális terápiás célpontok lehetnek a jövőben. Az Nkx2-3 faktor emberben és egerben is a lamina propria alatti izomrétegben expresszálódik (*Wang és tsai, 2000*), tehát az Nkx2-3 hiányában tapasztalt fokozott epitel regeneráció feltételezhetően a miofibroblasztokban kifejtett hatásnak köszönhető, amely az intesztinális őssejtek homeosztázisát a Wnt jelátvitelen keresztül befolyásolhatja. (*Perochon és tsai, 2018; Yu és tsai, 2010*) A kérdés tisztázására az Nkx2-3 sejtvonalspecifikus deléciójával kaphatunk választ, azonban a megfelelő módon floxolt Nkx2-3 genotípusú egér egyelőre nem áll rendelkezésre.

Alternatív eljárásként a jövőben az izolálásukat követően intesztinális strómasejtek alcsoportjainak részletes vizsgálatával szeretnénk azonosítani azokat az összetevőket, melyek Nkx2-3 hiányában hozzájárulnak a colitis elleni védettség kialakulásához. Vizsgáljuk továbbá azokat a limfoid és epitel összetevőket, melyek Nkx2-3⁺ strómasejtek szabályozó hatása alatt állhatnak. Ezen sejtek és mechanizmusok felderítése során új terápiás célpontokat találhatunk nem csak IBD, de más gyulladásos kórképek kezelésére is.

6. Új eredmények összefoglalása

Kutatómunkánk célja az Nkx2-3 transzkripciós faktor szerepének vizsgálata volt a lamina propria ILC3 sejtjeinek megoszlásában, SILT képződésben, valamint a gyulladásoos bélbetegségek lefolyásának szabályozásában.

PhD dolgozatomban Nkx2-3^{-/-} (endotél MAdCAM-1 hiány) és MAdCAM-1^{-/-} (általános MAdCAM-1 hiány) egereken végzett kísérletekkel az alábbi kérdéseket válaszoltuk meg:

- **Hogyan változik a lamina propria ILC3 sejtek megoszlása a bélben Nkx2-3 illetve MAdCAM-1 hiányában posztnatális és felnőtt korban?**
 - Az ILC3 sejtek megtelepedése Nkx2-3^{-/-} és MAdCAM-1^{-/-} egerek mindkét vizsgált bélszakaszában végbemegy.
 - Az ILC3 abszolút szám minden vizsgált egértörzsben magasabb volt a vékonybélben, mint a colonban.
 - Nkx2-3 hiányában az első posztnatális hét után csökken az siILC3 sejtek száma, a MAdCAM-1 adresszin endotél expressziójának fokozatos megszűnése miatt, míg MAdCAM-1^{-/-} egerekben az általános MAdCAM-1 hiány következtében az ILC3 sejtek abszolút száma minden vizsgált időpontban a legalacsonyabb volt, ráadásul ez az alacsony sejtszám fokozatos csökkenést is mutatott. Ez a csökkenés a vékonybélben nem volt olyan kifejezett, mint a colonban.
 - Felnőtt korban Nkx2-3^{-/-} egerekben magasabb volt a ROR γ ⁺ ILC3 sejtek száma a colonban, mint a vad típusú csoportban.
- **Milyen hatással van az Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiánya a SILT fejlődésre és megoszlásra posztnatális és felnőtt korban?**
 - C57BL/6 alapú MAdCAM-1^{-/-} és vad típusú egerekben a CP kialakuláshoz képest az imILF-é majd matILF-é érés folyamata késleltetett a colonban.
 - A megváltozott PNAd mRNS expresszió mindkét törzsben lehetővé teszi a MECA-79 szulfatált szénhidrát-függő epitóp megjelenését.
 - A két különböző fokú MAdCAM-1 hiányban szenvedő egértörzsben a PNAd expressziós szintjének növekedése általi kompenzáció, különböző core protein és glikozilációs enzim mRNS expressziós mintázat révén valósul meg.
 - MAdCAM-1 hiányában a PNAd adresszin expressziós szintjének növekedése ellenére is az ILF érés nagymértékben gátolt.
 - Nkx2-3^{-/-} egerekben a részlegesen megtartott MAdCAM-1 expresszió miatt kevésbé súlyos az ILF érés gátlása.
 - Nkx2-3^{-/-} és MAdCAM-1^{-/-} egerekben az éretlen SILT struktúrák magasabb arányát az endotél MAdCAM-1 hiánya okozza.
 - MAdCAM-1^{-/-} egerekben a pLN-ek szerkezete és funkciója megtartott, ami alapján az ILC3/LTi sejtek más endotél ligandok által is eljutnak a nyirokcsomó előtelepbe.
- **Milyen eltérések figyelhetők meg felnőtt Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányos egerekben DSS indukálta colitis lefolyásában, a lamina propria ILC3 sejtek és SILT struktúrák megoszlásában?**
 - Nkx2-3^{-/-} egerekben DSS kezelés hatására megemelkedett az érett ILF struktúrák száma, viszont nem alakult ki colitis.
 - MAdCAM-1^{-/-} egerekben DSS kezelés hatására a CP-ILF átalakulás alacsony számban ment végbe, a kialakult colitis viszont igen súlyos mértékű volt, tehát Nkx2-3 deficiens egerekben nem önmagában a MAdCAM-1 endotél hiánya

következtében tér el a felnőttkori SILT fejlődés és alakul ki védettség colitisszel szemben.

- A colitis ellen fellépő védettség mellett Nkx2-3 hiányában felszaporodtak a ROR γ ⁺ ILC3 sejtek a colonban.
- ***Mi befolyásol(hat)ja a DDS indukált colitis eltérő lefolyását Nkx2-3 hiányában??***
 - DSS kezelés során csak Nkx2-3 egerekben nem alakult ki gyulladás, így a colitisszel szembeni védettség a MAdCAM-1 adreesszintől független.
 - Nkx2-3^{-/-} egérben az antagonista anti-IL-22 antitest kezelés hatására sem alakult ki gyulladás, tehát a colitisszel szembeni védelem nem IL-22 mediálta folyamat.
 - Vad típusú egerekben a normál hematopoetikus sejtek Nkx2-3 hiányos sejtekkel helyettesítése nem akadályozta meg a colitis kialakulását, tehát az Nkx2-3 faktor szerepe a nem-hematopoetikus strómasejtekkel hozható összefüggésbe.
 - LacZ-Nkx2-3^{+/-} riporter egereken végzett immunhisztokémiai és X-gal festés kombinációjával kimutattuk az Nkx2-3 faktor expresszióját a bélfal tunica-muscularis-mukóza rétegében található VAP-1⁺ miofibroblasztokban.

7. Publikációk listája

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Vojkovics D, Kellermayer Z, Gábris F, et al. Differential effects of the absence of Nkx2-3 and MAdCAM-1 on the distribution of intestinal type 3 innate lymphoid cells and postnatal SILT formation in mice. *Front Immunol*. 2019 Mar 5;10:366.

IF: 5,511

Kellermayer Z, **Vojkovics D**, Dakah TA, et al. IL-22-independent protection from colitis in the absence of Nkx2-3 transcription factor in mice. *J Immunol*. 2019; pii: ji1801117.

IF: 4,539

Vojkovics D, Kellermayer Z, Balogh P., et al. Nkx2-3 – a slippery slope from development through inflammation toward hematopoietic malignancies. *Biom. Ins*. 2018; 13: 1–6.

Kellermayer Z, **Vojkovics D**, Balogh P. Innate lymphoid cells and their stromal microenvironments. *Immunol Lett*. 2017; Sep; Volume 189:3-9.

IF: 2,438

Egyéb közlemények

Vojkovics D, Kellermayer Z, Balogh P. et al. Isolation and characterization of a murine spontaneous high-grade follicular lymphoma with restricted in vivo spreading--a model for lymphatic metastasis via the mesentery. *Pathol Oncol Res*. 2016; Apr; 22 (2):421-30. doi: 10.1007/s12253-015-0025-6.

IF: 1,935

Összes IF: 14,423

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni hálámat mindazoknak, akik segítségével PhD munkám nem valósulhatott volna meg.

Elsősorban témavezetőmnek Prof. Dr. Balogh Péternek szeretnék köszönetet mondani tudományos diákköri, majd PhD hallgatói éveim során nyújtott támogatásáért, útmutatásáért, gyakorlati tanácsaiért.

Külön köszönettel tartozom munkatársamnak Dr. Kellermayer Zoltánnak a laboratóriumi technikák elsajátításában és a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségével.

Köszönettel tartozom az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden dolgozójának segítségükért és támogatásukért.

Köszönöm Dr. Berta Gergelynek a konfokális mikroszkópos képek elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm Borbásné Dr. Farkas Kornéliának, hogy segítséget nyújtott eredményeim statisztikai kiértékelésében.

Hálásan köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy mindvégig támogattak és bíztattak munkám során.

Munkám az alábbi támogatások segítségével valósult meg:

OTKA-108429

EFOP-3.6.1.-16-2016-00004

FIKP-20765-3/2018/FEKUTSTRAT