

# Az Nkx2-3 transzkripciós faktor szerepe a lép és a bél vaszkuláris-stromális szerveződésében

Doktori (PhD) tézis

Dr. Gábris Fanni

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Balogh Péter, egyetemi tanár

Programvezető: Prof. Dr. Berki Tímea, egyetemi tanár

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem,  
Klinikai Központ  
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet



Pécs, 2023.

# 1. Bevezetés

## 1.1 A lép stómális szerkezete és szerepe az extramedulláris vérképzésben

A lép alapszerkezete a különböző gerinces osztályok között és az emlősökön belül az egérben és humán fajban nagyfokú hasonlóságot mutat, ugyanakkor akár ezen két faj lép-szerkezete között is számos eltérés áll fenn (Balogh and Lábadi 2010). A lép fibrózus tokkal körülvett nyirokszervünk, melyet szerkezetileg két nagy részre, fehér pulpára (WP) és a vörös pulpára (RP) osztunk (Steiniger 2015). Egérben a két területet a fehér pulpa részét képező marginális zóna (MZ) határolja el egymástól, emberben ezt a területet perifollikuláris zónának nevezzük. A perifériás nyirokszövetek stromális és parenchymális sejtekből épülnek fel. A nyirokszöveti stróma sejteket összefoglalóan retikuláris fibroblasztoknak (FRC) nevezzük, melyeknek elhelyezkedésük és funkciójuk alapján az alábbi négy fő csoportját különítjük el: marginális zóna retikuláris sejtek (MRC), B-sejt zóna fibroblasztok (BRC), T-sejt zóna fibroblasztok (TRC) és perivaszkuláris retikuláris sejtek (PRC) (Onder, Cheng and Ludewig 2022).

Az immunválasz kialakításában a T-, és B-sejteknek helyt adó WP játszik jelentős szerepet, a RP részt vesz a kórokozók és az előregedett vörösvérsejtek kiszűrésében, és az extramedulláris vérképzésben (EMH). A hemopoetikus őssejtek (HSC) jelenléte nyugalmi állapotú humán lépben a vörös pulpában a szinuszoidok közvetlen közelében mutatható ki (Dor et al. 2006, Inra et al. 2015). A HSC-k fenntartásához szükséges mikrokörnyezet szempontjából meghatározó jelentőségűek a RP stróma sejtek (Oda et al. 2018).

## 1.2 A bél és a colorectalis carcinoma stromális szerkezete és az intesztinális őssejtek

Az emlős gasztrointesztinális rendszer élettani szempontból kitüntetett jelentőségű. A bélfal luminális oldala felől helyezkednek el az integritás fenntartásáért felelős epitél sejtek, melyek a multipotens intesztinális őssejtek (ISC) osztódása és differenciálódása révén 3-5 nap alatt megújulnak. Az epitél sejtek alatt, a számos sejtípusnak helyt adó lamina propria (LP) rétege található. Ebben a lazarostos kötőszövetben különböző típusú fibroblasztok, periciták, vér és nyirok endotél sejtek, neuronális sejtek és immunsejtek vannak jelen. A lamina propriát a körkörös és hosszanti simaizom réteg választja el a bélfal legkülső rétegétől, a szerózáttól.

A vékonybél kriptáinak alján a Paneth sejtek közé ékelve kb. 12-16 ISC foglal helyet, melyek osztódásukat követően hozzák létre az átmeneti osztódási zónát. Az itt található sejteket nagy osztódási kapacitás, de rövid élettartam jellemzi. Belőlük származnak a differenciálódott enterociták, kehelysejtek, kefesejtek, Paneth sejtek, és enteroendokrin sejtek (van der Flier and Clevers 2009). A konvencionális ISC-en kívül a kripták aljától számított +4-es pozícióban található a tartalék ISC-k, melyek normál állapotban nem viselkednek őssejteként, viszont súlyos károsodások, mint például irradiációt követően leucinban gazdag ismétlődést tartalmazó G-fehérje kapcsolt receptor 5 (Lgr5)<sup>+</sup> ISC-ké képesek alakulni (Metcalf et al. 2014). A humán vastagbéllel ellentétben az egér colonban Paneth sejtek nincsenek jelen (Sasaki et al. 2016, Wang et al. 2020).

Az ISC-k önmegújulásához és differenciálódásához számos mikrokörnyezeti jel, transzkripciós faktor és metabolikus útvonal együttműködésére van szükség (Zhu, Hu and Xi 2021). Ezek közül a legtöbbet tanulmányozott a Wnt/ $\beta$ -katenin, R-spondin, Notch, epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és csont morfogenetikus fehérje (BMP) szerepe. Míg a Wnt jelátviteli útvonal fő feladata az ISC osztódásának fenntartása, a BMP az őssejtek differenciálódását segíti elő. A kripták tengelye mentén megfigyelhetők a Wnt és BMP expresszió ellentétes irányú grádiense (Qi et al. 2017).

A bél lamina propriában elhelyezkedő mezenchimális eredetű stróma sejtek karakterizálása a mai napig számos kutatás tárgyát képezi. Az eddig leírt gének és fehérjék többsége nem

specifikus egyetlen stróma sejtcsoportra sem, ezért gyakran átfedés található a fenotípusos jellemzések során. Az egér vékonybél stróma sejteken végzett scRNA szekvenálási adatok alapján az mezenchimális stróma sejtekre jellemző a vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR) $\alpha$  expresszió, mely megkülönbözteti őket az  $\alpha$ SAM (másnéven Acta2)<sup>+</sup>/miozin nehéz lánc 11 (Myh11)<sup>+</sup> miofibroblasztoktól (McCarthy et al. 2020, Hsia et al. 2016). A stróma sejtek PDGFR $\alpha$  expressziójának vizsgálatok a villusoktól a kripták irányába csökkenő grádiensét írták le. Ez alapján megkülönböztetünk PDGFR $\alpha^{\text{high}}$  és PDGFR $\alpha^{\text{low}}$  csoportokat.

A gasztrointesztinális rendszer leggyakrabban diagnosztizált malignus elváltozása a colorectalis carcinoma (CRC), mely egyben a harmadik leggyakoribb tumoros halálozási ok (Arnold et al. 2017). A tumor mikrokörnyezetének részét képezik többek között az extracelluláris mátrix komponensek, az immunsejtek és endoteliális sejtek; ugyanakkor jelentős hányadát a tumor asszociált fibroblasztok (CAF) teszik ki. A CAF egy gyűjtőfogalom, mely - függetlenül a sejtek eredetétől - az invazív tumor és metasztázis körül elhelyezkedő fibroblasztokat jelöli (Sahai et al. 2020). Szöveti azonosításuk nehézkes, mivel nem ismert egyetlen univerzális marker, mely az összes CAF sejtet jelölné, a leggyakrabban használt markerek a fibroblaszt aktivációs fehérje (FAP), PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$  és a Thy-1/CD90. Eredetüket tekintve kialakulhatnak helyi fibroblasztokból, csontvelő eredetű mezenchimális sejtekből és egyéb, nem stróma eredetű sejtekből is (így epitél, endotél, pericita, zsírsajt, simaizomsajt (Sahai et al. 2020, Kalluri 2016)). A CAF sejtek különböző módokon befolyásolják a tumor progresszióját és regresszióját. Pozitív összefüggés mutatkozik az invazív CRC-t körülvevő stróma sejtek mennyisége és az elváltozás okozta halálozási ráta között (Huijbers et al. 2013).

### 1.3 Az NK2 transzkripciós osztály

A többsejtű komplex szervezetek kialakulásához nélkülözhetetlen a génextpresszió nagyfokú szabályozása és megfelelő működése, melyben jelentős szerepet töltenek be a homeobox (Hox) géncsalád tagjai. A homeobox gének két legnagyobb csoportját a HOX és az NK osztályba tartozó gének teszik ki (Vojkovic et al. 2018). Az NK gének a HOX génekkel ellentétben nem klaszterekbe rendeződve, hanem szétszórtan vannak jelen a genomban (Pabst et al. 1997). Drosophilában az NK géneknek 2 osztályát különítjük el. Az NK-1 osztály tartalmazza az NK-1 családot, az NK-2 osztály pedig az NK-2, NK-3 és NK-4 családokat (Vojkovic et al. 2018). Az NK-2 család tagjai számos szerv és szövet fejlődésében részt vesznek. A jelátviteli útvonalak szabályozása révén hatással vannak a sejtek differenciációjára, migrációjára és érésére, befolyásolva a szervek normális struktúrájának kialakítását és funkciójuk fenntartását (Hombria and Lovegrove 2003). Összességükben az emlős Nkx (emberben NKX) gének kiterjedt hálózatot alkotnak, szövetspecifikus mintázattal. Károsodott működésük számos szerv és szervrendszer működési zavarához vezetnek.

### 1.4 A Nkx2-3 transzkripciós faktor szerepe a lép fejlődésében

A lép kialakulását egérben a splanchnicus mezenchimális előtelep létrejötte indítja el az embrionális 10-10,5 napon (Hecksher-Sørensen et al. 2004). A folyamat szabályozásában számos transzkripciós faktor részt vesz, úgy, mint a pre-B sejt leukémia transzkripciós faktor 1 (Pbx1), Tlx1 (korábbi nevén HOX11), Nkx2-5 és Nkx3-2 (korábbi nevén Bapx1 (Brendolan et al. 2007, Brendolan et al. 2005)); ezek hiányában asplenia alakul ki.

Oliver Pabst és munkatárainak nevéhez fűződik a megfigyelés, miszerint Nkx2-3 KO egerek lépének mérete elmarad a vad típusú egerekéhez képest, egy részükre (kb. 20%) asplenia jellemző. Felnőtt mutáns egerekben a fehér pulpa csökkent méretű, egyértelmű folliculáris szerkezet nem azonosítható. A mutáció következtében mind a vörös pulpa, mind a marginális

zóna szinusz endotél sejtjeinek képződési zavara megfigyelhető (Balogh et al. 2007), a MZ szinusz endotél sejtekben az Nkx2-3 célgénje által képzett MAdCAM-1 expresszió elmarad (Wang et al. 2000, Pabst et al. 2000). A limfotoxin- $\beta$ -receptor (LT $\beta$ R)/nukleáris faktor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) jelátviteli útvonal, illetve utóbbi elemeinek (RelB, p52) hiányában a marginális zóna szinusz endotél sejtjeinek kialakulása gátolt, viszont a vörös pulpa szinusz endotél sejtjeinek fejlődése zavartalan (Balogh et al. 2007).

Nkx2-3<sup>-/-</sup> egerek lépében a nyirokcsomó magasendotelű venuláira (HEV) jellemző érstruktúrák jelennek meg, melyek kialakulása LT $\beta$ R-függő folyamat (Czömpöly et al. 2011). Ezen érstruktúrák posztnatális érésen mennek keresztül, melynek során a MAdCAM-1 addresszint fokozatosan felváltja a perifériás nyirokcsomó addresszin (PNAd) megjelenése. A PNAd<sup>+</sup> endotél sejtek CCL21 kemokint termelnek és biztosítják a homing folyamatot az L-szelektin liganddal rendelkező limfociták számára. A mutáns lépben megfigyelhető a T/B sejtek arányának nyirokcsomószerű eltolódása is (Czömpöly et al. 2011).

Nkx2-3 hiányában a lép limfocitákkal kitöltött, nyirokér endotél hialuronan receptor 1 (LYVE-1) pozitív érképződményeket tartalmaz (Kellermayer et al. 2011). Ezen lépek qPCR elemzése a LYVE-1 és a podoplanin/gp38 mRNS szintjének jelentős növekedését mutatta a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor 3-as típus (VEGFR-3) és a prospero homeobox fehérje 1 (Prox-1) mRNS szintjének növekedése nélkül, mely utóbbi kettő specifikusak a nyirokendotél sejtekre (LEC).

Nkx2-3 hiányában a lépben megfigyelhető szerkezeti eltérések a lép immunológiai funkcióinak csökkenésével járnak együtt. A marginális szinusz endotél sejtekből hiányzó MAdCAM-1 addresszin kisebb mértékű limfocita recirkulációt, és a makrofágok csökkent mértékű jelenléte a kórokozók kiszűrésének károsodását eredményezi (Balogh et al. 2007, Czömpöly et al. 2011). Továbbá, Nkx2-3 hiányában megfigyelhető a B-sejtek érési defektusa, melynek következtében károsodott a T-dependens antitest-válasz és az affinitás érés (Tarlinton et al. 2003).

### **1.5 Az Nkx2-3 szerepe a bél fejlődésében**

Oliver Pabst és kutatócsoportja 1997-ben számolt be arról, hogy egér embrióban az Nkx2-3 mRNS jelen van a középbél és a vastagbél mezoderzában, expressziója posztnatális korban is kimutatható (Pabst et al. 1997). Megfigyelték, hogy az Nkx2-3 homozigóta mutáns egerek több, mint fele elpusztul a leválasztási időszakban, melynek hátterében a vékonybél fejlődésének zavarát feltételezték (Pabst et al. 1999). Embriionális szövettani metszeteken a jejunum és az ileum területén a villusok száma csökkent, melyhez elvékonyodott mezenchima réteg társul. Ezek a károsodások a korai posztnatális időszakban is fennállnak, de nem figyelhetők meg a duodénumban és a colonban.

Felnőtt Nkx2-3 mutáns egerek vékonybelének és vastagbelének hossza megtartott, viszont a bélszakaszok átmérője megnövekedett, vaszkularizáltsága pedig fokozódott a kiütött gén hiányában. A vékonybelében megnyúlt, vékony villusok és kiterjedt kripták vannak jelen, melyekben megnövekedett sejtosztódás, és a kontrollhoz viszonyított normális mértékű apoptózis figyelhető meg. Ezen eredmények alapján merült fel annak a lehetősége, hogy a mezenchimális Nkx2-3 expresszió hatással van az epitél sejtek osztódására (Pabst et al. 1999).

Nkx2-3 hiányában a vékonybélben kevesebb és kisebb méretű Peyer-plakkok vannak jelen. Posztnatálisan a Peyer-plakkok HEV felszínén MAdCAM-1 expresszálódik, mely részt vesz a limfociták nyálkahártya homing folyamatában az  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 integrinen keresztül. Nkx2-3 hiányában az endotél sejtek felszínéről a MAdCAM-1 fokozatosan eltűnik, helyette PNAd jelenik meg, mely magyarázatul szolgálhat az Nkx2-3 hiányában tapasztalt csökkent Peyer-plakk méretre (Wang et al. 2000, Kellermayer et al. 2014). Az Nkx2-3 delécioja hatással van az ILC-k 3-as (ILC3) típusába tartozó sejtjeinek intesztinális megoszlására is.

## 2. Célkitűzés

Kutatómunkám során céлом volt az Nkx2-3 fehérje lép vörös pulpa organizációjában és ezáltal az extramedulláris vérképzésben betöltött szerepének részletesebb vizsgálata, valamint a hiányában megjelenő LYVE-1 pozitív ér képződmények eredetének feltárása. Továbbá vizsgáltam az NKX2-3 fehérje különböző korú intakt, pre-malignus és malignus elváltozásokat tartalmazó humán vastagbélben való kifejeződését szövettani mintákon. Kísérleteket végeztünk az NKX2-3<sup>+</sup> stróma sejtek fenotípusos meghatározására.

Az alábbi kérdéseket kívántuk megválaszolni:

### **A) Nkx2-3 hiányának hatása a lép endotél sejtjeire és vörös pulpára:**

**A1, Milyen eredetűek a lépben Nkx2-3 hiányában megjelenő LYVE-1 pozitív zsákszerű képződmények?**

**A2, Az ismert szerkezeti eltéréseken kívül, milyen hatással van az Nkx2-3 hiánya a lép vörös pulpa szinusz endotél sejtjeire?**

**A3, Milyen hatással van az extramedulláris vörösvértest-képzésre az Nkx2-3 hiánya?**

**A4, Az Nkx2-3 hiányában fennálló károsodott extramedulláris vérképzés befolyásolja-e a lépben a megakariociták előfordulását és azok expanszióját?**

### **B) NKX2-3 szerepe a vastagbél stromális elemeinek szerveződésében:**

**B1, Van-e különbség az NKX2-3 transzkripciós faktor expressziójában különböző korcsoportú intakt humán colon szövettani mintákban?**

**B2, Mely stromális elemhez/elemekhez köthető az NKX2-3 fehérje expresszió humán vastagbélben?**

**B3, Változik-e az NKX2-3 expresszió pre-malignus és malignus humán vastagbél folyamatokban?**

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1 Kísérleti állatok

A stressz vérképzés vizsgálatához fiatal felnőtt (8-10 hetes) Nkx2-3<sup>-/-</sup> és vad típusú BALB/c nőstény egereket használtunk. A stressz vérképzés előidézéséhez az oldalsó farokvéna punkciójával három alkalommal, 2 napos regenerációs idők közbeiktatásával, vért vettünk. A hetedik napon az egereket termináltuk, vérüket sejtes és szerológiai vizsgálatok céljából gyűjtöttük, míg a csontvelőt és a lépet áramlási citometriás és immunhisztológiai analízisnek megfelelően dolgoztuk fel. A megakariociták stimulálását Romiplostimmal idéztük elő, (Sparger et al. 2018, Slayton et al. 2002). A lépeket a kezelést követő hetedik napon dolgoztuk fel. A LEC-ek azonosításához Prox1<sup>GFP</sup>-Nkx2-3<sup>-/-</sup> állatokat használtunk (Choi et al. 2011).

A kísérleteket a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérletek Etikai Bizottsága által meghatározott irányelveknek megfelelően, a BA02/2000-16/2015 és BA02/2000-43/2021 engedélyszámokon végeztük, a géntechnológiával módosított szervezetek felhasználása a Vidékfejlesztési Minisztérium által kiadott SF/27-1/2014 számú engedélye alapján történt.

#### 3.2 Áramlási citometria

A csontvelő és a lép sejtes összetételét áramlási citometriával határoztuk meg. A csontvelőt a combcsontokból nyertük ki. A lép sejtjeit 2 tárgylemez segítségével extraháltuk, majd vattán szűrtük. LUNA-II típusú automata segítségével sejtszámolást végeztünk. A sejtszuspenziót különböző jelölt és jelöletlen antitestekkel inkubáltuk jégen 20 percig. A jelöletlen antitesteket jelölt másodlagos antitestekkel detektáltuk. Mintáinkat 1% formaldehid tartalmú PBS oldattal fixáltuk.

A LEC-ek vizsgálatához a Prox1<sup>GFP</sup>-Nkx2-3<sup>-/-</sup> egerekből származó nyirokcsomó és lép mintákat DNase I/Liberase (Roche) koktéllal emésztettük, a különböző monoklonális antitestekkel történő jelölést követően, az elhalt sejtek kizárása 7-aminoaktinomicin D (7AAD) használatával történt.

A minták mérése BD FACSCalibur típusú áramlási citométerrel történt, elemzésüket FCS Express v.6 és FlowJo w10. programokkal végeztük.

#### 3.3 Immunfluoreszcencia és immunhisztokémia az állatkísérletek során

Az egerek lépéből 8 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket szárítás után hideg acetonnal fixáltunk. Az immunfluoreszcens jelöléshez mintáinkat különböző jelölt és jelöletlen antitestekkel szobahőn 45 percig inkubáltuk. Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz 0,1% fenil-hidrazin oldattal endogén peroxidáz gátlót végeztünk. Metszeteinket különböző antitestekkel jelöltük. Mintáinkat ImmPRESS kecske anti-patkány IgG peroxidáz konjugátummal inkubáltuk és a reakciót DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szubsztrát keverékkel tettünk láthatóvá. A magfestéshez Mayer-féle hematoxilint alkalmaztunk, víztelenítés után Pertex médiummal fedtük.

A szövettani mintákról Olympus BX61 típusú mikroszkóp és ZEN program segítségével fényképeket készítettünk. A fényképek utómunkája Photoshop programmal készült. A statisztikai analízishez az immunhisztokémiai mintáinkat Panoramic View szkennelvel (3D Histech, Budapest) digitalizáltuk és QuPath-0.2.3 szoftverrel értékeltük.

A Prox1<sup>GFP</sup>-Nkx2-3<sup>-/-</sup> és kontroll heterozigóta egerekből származó teljes lépmintákat 4% paraformaldehid oldatban fixáltuk majd CUBIC (Susaki et al. 2014) módszerrel tettük transzparenssé. A lép preparátumokat Olympus FluoView FV1000 lézer szkennelési konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (Olympus Europa SE & Co., Hamburg, Németország). A 3D képek Z-stack adatok felhasználásával, Imaris Software (Bitplane AG, Zurich, Svájc) alkalmazásával készültek.

### **3.4 Vérvkép paraméterek és EPO ELISA**

A vérvkép paraméterek vizsgálatához 150-200 µl vért gyűjtöttünk K3 EDTA tartalmú 0,25/0,5 ml MiniCollect Complete típusú vérvételi csövekbe. A vérmintákat Sysmex XN-V1000 típusú hematológiai automatával és annak szoftvercsomagijával mértük és elemeztük. A szérum eritropoetin szintet Legend Max egér EPO ELISA kittel (BioLegend, Biomedica Hungaria, Budapest) határoztuk meg.

### **3.5 A humán minták vizsgálatba történő beválasztási kritériumai**

Vizsgálatunkba a Pécsi Tudományegyetem Patológiai Intézetének szövetbankjában diagnosztikai céllal tárolt mintáit vontuk be. Kizárólag a vizsgálat elvégzése céljából nem történt mintavétel. A vizsgálat során 5 kategóriát határoztunk meg, melyek a morfológiailag intakt csecsemő és kisgyermek korúak (0-3 év, átlagos életkor: 1,3 év, n=10), a morfológiailag intakt fiatal felnőtt korúak (15-20 év, átlagos életkor: 17,9 év, n=5), morfológiailag intakt felnőtt és idős korúak (50-80 év, átlagos életkor: 65,8 év, n=10), a vastagbél polippal diagnosztizáltak (46-73 év, átlagos életkor: 62,5 év, n=10) és a vastagbél tumorról diagnosztizáltak (63-88 év, átlagos életkor: 71,7 év, n=15) voltak. Morfológiailag intakt szövettani mintának tekintettük azokat, melyekben sem gyulladásos, hypoxiás vagy nekrotikus, sem tumoros elváltozás nem volt megfigyelhető. A csecsemő és kisgyermekkorúak csoportjában colon atresia és Hirschsprung betegség miatt történt mintavétel, az elemzéshez a fenti szempontok szerint morfológiailag intaktnak tekinthető szövetrészt használtuk fel. A vastagbél polippal diagnosztizált betegek szövettani diagnózisa adenomatous polip low-grade dysplasiával, a vastagbél tumorról diagnosztizált betegek adenocarcinoma (CRC) volt. A minták kiválasztásában tapasztalt patológus szakorvos volt segítségünkre. A vizsgálat etikai engedélyének kiállítója a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatás-Etikai Bizottsága, etikai engedélyének száma: 8578-PTE 2020.

### **3.6 Humán minták szövettani elemzése**

A metszetek digitalizálását követően (PannoramicMidi scanner) a szövettani elemzés a QuPath-v0,2,3 program segítségével történt. A metszeteken a lamina propria rétegében véletlenszerűen kiválasztottunk 5 területet, melyek körülbelül 150-200 sejtmagot tartalmaztak. A program segítségével a sejtmagi DAB intenzitás alapján a sejteket 4 csoportba soroltuk, negatív (nukleáris DAB optikai sűrűség (OD) átlaga <0,2) gyenge pozitív (nukleáris DAB OD átlaga 0,2-0,4 között) közepesen erős (nukleáris DAB OD átlaga 0,4-0,6 között) és erősen pozitív (nukleáris DAB OD átlaga > 0,6). Az elemzés során megkaptuk minden kijelölt területre vonatkozóan a benne lévő sejtmagok számát, azok besorolását a nukleáris DAB OD átlag intenzitás alapján. A kettős jelölések során a piros, barna és kék reakció termékek esetén a képek RGB színidekonvolúcióját követően manuális sejtszámolást végeztünk. A mintáinkat histoscore (H-score,  $H\text{-score} = [1x \times (\text{gyenge festődésű sejtmagok százalékos értéke az összes detektált sejthez viszonyítva}) + 2x \times (\text{közepesen festődő sejtmagok százalékos értéke az összes detektált sejthez viszonyítva}) + 3x \times (\text{erősen festődő sejtmagok százalékos értéke az összes detektált sejthez viszonyítva})]$ , értéke 0-300 között) értékkel is jellemeztük.

### **3.7 Statisztikai analízis**

A minták statisztikai elemzését GraphPad Prism9 programmal végeztük. A statisztikai értékeléshez Mann-Whitney U tesztet és Fisher-féle egzakt tesztet végeztünk. A szignifikancia szinteket \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 és \*\*\*\*p<0,0001 értékkel határoztuk meg.

## 4. Eredmények

### 4.1 Az Nkx2-3 hiánya ektópiás nyirokerek megjelenéséhez vezet a lépben

Nkx2-3 hiányában a lépben LYVE-1 pozitív érkepletek azonosíthatók, melyeket ER-TR7 mAb-el (anti-egér kollagén VI, (Schiavinato et al. 2021)) jelölődő fibroblaszt hálózat vesz körül. Azonban sem immunhisztokémiai, sem mRNS expressziós vizsgálatokkal nem sikerült a nyirokendotél eredetét alátámasztó, megnövekedett Prox-1 expressziót kimutatni (Kellermayer et al. 2011). A Prox-1 az egyik fő szabályozó fehérje a LEC irányú differenciáció során, míg a LYVE-1 a nyirok endotél sejteken túl a szerózális makrofágokon és a lép megakariociták felszínén is jelen van. Ezért, a Prox-1 által irányított eGFP kifejeződés vizsgálatán keresztül kerestünk választ a LYVE-1-pozitív képletek szöveti eredetének megállapítására.

#### 4.1.1 Ektópiás nyirokerek megjelenése Nkx2-3<sup>-/-</sup> lépben

Jelen vizsgálatunk során intézetünkben Nkx2-3<sup>-/-</sup> és Prox1<sup>GFP</sup> egerek keresztezésével létrehozott KO/eGFP mutáns állatokon vizsgáltuk az ektópiás LYVE-1<sup>+</sup> erek eredetét. Az Nkx2-3 mutáns és heterozigóta lépeket CUBIC módszerrel transzparensé tettük (Susaki et al. 2014). A mutáns lépek a kezelést követően teljes mértékben áttetszővé váltak, míg a heterozigóta lépekben a bennmaradó hemoglobin következtében maradtak fel nem tisztult területek. A transzparens mutáns lépmintákat konfokális mikroszkóppal elemezve kiterjedt Prox-1<sup>+</sup> hálózatot detektáltunk, számos faágyszerű elágazással és gyűrűszerű kapcsolatokkal. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy Nkx2-3 hiányában nyirokér kapilláris-hálózatból álló struktúra képződik. Prox1-Nkx2-3 heterozigóta egerek lépének vizsgálatakor kapilláris-szerű hálózat nem volt jelen.

Eredményünk megerősítéseként Prox1<sup>GFP</sup>-Nkx2-3 mutáns egerek lépét áramlási citometriás módszerrel vizsgáltuk. A GFP<sup>+</sup> sejteket CD45<sup>-</sup>gp38<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> fenotípus jellemezte, mely megegyezik a nyirokcsomóban jelen lévő nyirokendotél sejtek fenotípusával. A GFP<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> sejteken belül sikerült további nyirokszöveti stróma csoportokat azonosítani, mint gp38<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup> folliculáris dendritikus sejtek és periciták, gp38<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup> fibroblaszt retikuláris sejtek, és gp38<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup> vér endotél sejtek (BEC) csoportjai. Nkx2-3 heterozigóta egerek lépéből GFP<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> sejteket nem tudtunk kimutatni. Az áramlási citometriai mérésekből származó eredményeink alátámasztják korábbi megfigyelésünket, miszerint az Nkx2-3<sup>-/-</sup> egerek lépében jelenlévő Prox1-irányította GFP<sup>+</sup> sejtek csoportját kizárólag a gp38<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> LEC sejtek alkotják. Ezek alapján elmondható, hogy Nkx2-3 hiányában a lép vörös pulpában ektópiás nyirok endotél-sejtekből képződő kapilláris hálózat jelenik meg.

#### 4.1.2 A lép vörös pulpában az Nkx2-3 hiánya károsodott érhálózat kialakulását okozza

A lép vörös pulpában Nkx2-3 hiányában a megjelenő nyirokér-kapillárisok mellett a vérer hálózat eltérései is megfigyelhetők. Intézetünkben az IBL-9/2 antitesttel korábban végzett kísérletek során leírásra került a vörös pulpa vénás szinusz rendszerének nagymértékű csökkenése (Balogh et al. 2007). Célul tűztük ki a vörös pulpa vaszkuláris hálózat további eltéréseinek megismerését, a Clever1 expresszió keresztül. A Clever1 a scavenger receptorok családjába tartozó endocitotikus fehérje, melyet a Stab1 gén kódol. Immunfluoreszcens mikroszkópos vizsgálataink során a vad típusú egerek mintáiban a Clever1 nagyrészt átfedést mutatott az IBL-9/2 jelöléssel.

Nkx2-3 hiányában mind az IBL-9/2, mind a Clever1 festődés hiányzott. Stab1<sup>-/-</sup> egerek lépmintáinak (melyek Clever1 fehérjét nem expresszálnak) az IBL-9/2-antitesttel történő vizsgálata során a vörös pulpa szinusz hálózatának mintázata épnek bizonyult a vad típusú mintával összehasonlítva. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az Nkx2-3 hiánya által



kiváltott vaszkuláris eltolódás érinti mind a vérereket tartalmazó vörös pulpa szinusz hálózat érését, mind nyirokér kapillárisok ektópiás megjelenését.

#### **4.1.3 Az Nkx2-3 hiányában károsodott vaszkuláris stróma befolyásolja az extramedulláris vörösvértestképzést**

A lép vörös pulpa stróma szerkezete a mai napig nem ismert teljes mértékben. Korábbi eredmények alapján a CD29<sup>+</sup> kötőszöveti sejtek részt vesznek az extramedulláris vérképzésben (O'Neill et al. 2019). Ezen kívül ismert, hogy az endotél sejteken kívül a vörös pulpa retikuláris stróma sejtek nagy része VCAM-1<sup>+</sup>. Megfigyeltük, hogy vad típusú/normál BALB/c egerekben mind a CD29, mind a VCAM-1 az ereken kívül dominánsan a vörös pulpa retikuláris stróma sejtjein expresszálódik. A CD29<sup>+</sup>/VCAM-1<sup>+</sup> stróma sejtek hálózatot képeznek a vörös pulpában (Lim and O'Neill 2019, O'Neill et al. 2019). Az Nkx2-3 mutáns egerek lépében a vaszkuláris és nem-vaszkuláris CD29<sup>+</sup>/VCAM-1<sup>+</sup> területek között CD45<sup>+</sup> területeket detektáltunk. Annak ellenére, hogy az Nkx2-3 hiányos egerek lépében tudtunk stromális és vaszkuláris CD29<sup>+</sup>/VCAM-1<sup>+</sup> sejteket azonosítani, a vörös pulpa fragmentált szerkezetet mutatott, a vörös pulpa-fehér pulpa közötti egyértelmű határvonal megléte nélkül.

Ezt követően adódott a kérdés, hogy a megváltozott vörös pulpa szerkezet miként érinti a lép hemopoetikus képességét. Mindenekelőtt összehasonlítottuk a kontroll BALB/c és az Nkx2-3<sup>-/-</sup> egerek alap hematológiai státuszát, mely alapján Nkx2-3 hiányában krónikus anaemia fennállása igazolódott a szignifikánsan alacsonyabb vörösvérsejt ( $p=0,008$ ), hematokrit ( $p=0,0143$ ) és hemoglobinszint ( $p=0,0073$ ) alapján. Ezzel szemben a teljes fehérvérsejt szám ( $p=0,0027$ ), mind a neutrofil granulociták ( $p=0,0007$ ) és limfociták ( $p=0,008$ ) száma szignifikánsan magasabbnak bizonyult a vad típusúhoz képest. Ismételt véreztetések hatására a BALB/c egerekben csökkent a vörösvérsejt ( $p=0,0303$ ) és hemoglobinszintje ( $p=0,0173$ ). A véreztetett Nkx2-3<sup>-/-</sup> egerekben mind a vörösvérsejt, mind a hematokrit és hemoglobinszint értéke szignifikánsan alacsonyabb volt a kezelt BALB/c egerekhez viszonyítva.

Annak tisztázása érdekében, hogy a látott változások hátterében nem az Nkx2-3 hiányában fennálló csökkent eritropoetin (EPO) szint áll, összehasonlítottuk a kezelt és kezeletlen BALB/c és Nkx-2-3 KO egerek szérumszintjét ELISA módszer segítségével. Kezeletlen Nkx2-3 hiányos egerekben az EPO szint szignifikánsan magasabbnak bizonyult a kontroll csoporttal képest ( $p=0,0011$ ), véreztetést követően ez a különbség továbbra is megmaradt, és jelentősen meghaladta a kezelt BALB/c egerekét. Mindezen eredmények azt mutatják, hogy egyensúlyi állapotban a megnövekedett EPO szint nem elegendő a normál hematokrit szint fenntartásához, és a stresszhatás következtében tovább emelkedett EPO termelés nem elegendő a stressz eritropoézis indukálásához Nkx2-3 hiányában.

A lép extramedulláris vérképző képességének vizsgálata céljából áramlási citometriás módszerrel meghatároztuk a TER-119<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> eritroid sejtek gyakoriságát és abszolút értékét kezeletlen és kezelt Nkx2-3 KO és BALB/c egerekben. Vizsgálatunk során kezeletlen Nkx2-3 hiányos egerekben a lép eritroid sejtjeinek gyakorisága és abszolút értéke is alacsonyabb volt a kontroll BALB/c egerekhez képest. Véreztetést követően Nkx2-3 hiányában a lép nem volt képes növelni eritropoetikus aktivitását, szemben a BALB/c egerek lépével, ahol egy robosztus növekedés volt megfigyelhető.

A csontvelőben alacsonyabb sejtszámot detektáltunk Nkx2-3 hiányában a kontrollhoz képest, mely a kezelést követően szignifikáns szintet ért el ( $p=0,0189$ ). Ez a csökkenés a kezelt BALB/c egerek esetében nem volt megfigyelhető. A kezeletlen csontvelőben a TER119<sup>+</sup> eritroid sejtek aránya magasabb volt Nkx2-3 hiányában a kontroll csoporttal összehasonlítva ( $p=0,0079$ ), míg a kezelést követően gyakoriságuk mindkét csoportban szignifikánsan emelkedett. Nkx2-3<sup>-/-</sup> egerekben a TER-119<sup>+</sup> sejtek százalékos aránya megnőtt a kezelést követően, míg az abszolút sejtszámok tekintetében csak BALB/c egerek esetében volt

szignifikáns ( $p=0,0046$ ) növekedés. Összességében a véreztetését követően mind a vad típusú, mind az Nkx2-3 KO egerekben fokozott csontvelői vörösvértestképzést figyeltünk meg, a BALB/c egerekkel szemben Nkx2-3 KO állatok lépében az eritropoetikus sejtek száma nem nőtt, mely eredmények arra engednek következtetni, hogy az Nkx2-3 hiánya nem a hemopoetikus őssejtek károsodása által vezet az extramedulláris vérképzés csökkenéséhez.

Immunfluoreszcens elemzések során a kezeletlen BALB/c egerek CD29<sup>+</sup> vörös pulpájában TER-119<sup>+</sup> eritroid sejtcsoportokat és eritrocitákat azonosítottunk, míg Nkx2-3 hiányában ezen TER-119<sup>+</sup> sejtcsoportok teljesen hiányoztak, csupán eritrociták voltak jelen. A kezelést követően a BALB/c egerekben a TER-119<sup>+</sup> területek összefolytak, gyakorlatilag teljesen kitöltötték a fehér pulpa közötti területeket. Ezzel szemben vérvesztést követően az Nkx2-3 hiányos egerekben a vörös pulpa TER-119<sup>+</sup> területei nem növekedtek, de a CD29<sup>+</sup> extravaszkuláris retikuláris sejtek jelen voltak, mely a szövet-specifikus eritropoetikus funkció károsodására utal. Ezen eredményeink alapján a lép nyugalmi állapotban fennálló csökkent eritropoetikus kapacitása mellett az indukált stressz vérképzés is jelentősen károsodott Nkx2-3 hiányában.

#### **4.1.4 Az Nkx2-3 hiánya blokkolja a lép megakariocita expanszióját TPO-agonista kezelést követően**

A lép vörös pulpa az eritroid sejtek termelésén túl a nem-limfoid hemopoetikus sejtvonalat képviselő megakariocitákat is tartalmaz (Noetzli, French and Machlus 2019). Annak tesztelésére, hogy a károsodott extramedulláris vérképzés befolyásolja-e a megakariociták előfordulását és azok expanszióját, az egereket trombopoetin (TPO)-agonista Romiplostimmal kezeltük (Léon et al. 2012). A kezelés hatékonyságát morфомetriai mérésekkel határoztuk meg CD41 immunhisztokémiai jelölést követően. A kezeletlen BALB/c egerekben a megakariociták a szubkapszuláris régióban és a vörös pulpa mélyebb területeiben helyezkedtek el egyesével, vagy kisebb csoportokat alkotva. Ezzel szemben az Nkx2-3<sup>-/-</sup> egerek lépében a megakariociták csak elszórtan voltak jelen, melyek túlnyomórészt a szubkapszuláris régióban helyezkedtek el. A Romiplostim kezelés a vad típusú lépben a trombociták számának jelentős növekedéséhez vezetett. Nkx2-3 hiánya esetén a megakariociták számában csak kismértékű növekedést tapasztaltunk. A sejtmagok morfológiája alapján a QuPath-0.2.3 programmal manuális sejtszámolást végeztünk. BALB/c egerek lépében körülbelül tízszeres növekedést ( $p=0,0053$ ) mutatott a megakariociták száma, mely növekedés Nkx2-3 hiányában nem volt detektálható. Eredményeink azt mutatják, hogy míg az Nkx2-3 KO egerek lépében csökkent számban a megakariociták jelen vannak, a lép nem képes ezen populáció számát növelni TPO-agonista kezelés hatására, szemben a BALB/c egerekkel.

## **4.2 NKX2-3 expresszió humán vastagbél szövettani mintákban**

A lépen kívül az NKX2-3 kifejeződésének elsődleges helye a béltraktus, ahol számos funkcionális adat utal az NKX2-3 faktor szerepére a lokális nyirokszövetfejlődésben és a nyirokszövetek homeosztázisának biztosításában. Ezzel szemben a humán szövetek NKX2-3 kifejeződése jelenleg csak kevésbé ismert, ezért humán bélmintákon vizsgáltuk az NKX2-3 termelődésének szöveti jellemzőit.

### **4.2.1 NKX2-3<sup>+</sup> sejtek elhelyezkedése és aránya morfológiailag intakt vastagbél szövettani mintákban**

Első lépésként a PTE Patológiai Intézetének archívumából származó morfológiailag intakt mintákon vizsgáltuk az NKX2-3 szöveti megoszlását. Az immunhisztokémiai elemzésbe bevont bélszakaszokat intaktnak tekintettük abban az esetben, ha nem volt megfigyelhető bennük gyulladásra, nekrozisra, hypoxiára vagy tumoros elváltozásra utaló jel. Az NKX2-3<sup>+</sup> sejtmagok túlnyomó többsége a tunica mucosa, kisebb mértékben a tunica muscularis rétegében

helyezkedett el. Az epítél sejtek rétegében az NKX2-3 transzkripció faktor jelenlétét nem tudtuk kimutatni. További részletesebb elemzésünkben a tunica mucosa lamina propria rétegében a hámphoz közel eső rétegben található NKX2-3<sup>+</sup> sejteket vizsgáltuk, mivel szakirodalmi adatok alapján a perikriptális NKX2-3<sup>+</sup> sejteknek szerepe van a bélhám őssejtek mikro környezetének szabályozásában (Hsia et al. 2016). A tunica mucosa lamina propria rétegében detektálható NKX2-3<sup>+</sup>sejtmagok homogén eloszlást mutatnak.

Ezt követően megvizsgáltuk a különböző korcsoportokban az NKX2-3 pozitív sejtek arányát az összes detektált sejthez viszonyítva. Eredményeink alapján az NKX2-3<sup>+</sup> sejtmagok százalékos aránya a 0-3 éves korosztályban volt a legmagasabb. A különbség szignifikánsnak bizonyult a 0-3 éves és 15-20 éves ( $p=0,0127$ ), valamint a 0-3 éves és 50-80 éves ( $p=0,0039$ ) korcsoportok között is, mindkét esetben a 0-3 éves korosztályban volt a legmagasabb az NKX2-3<sup>+</sup> sejtmagok aránya. A 15-20 éves és 50-80 éves csoportok között nem mutatható ki szignifikáns különbség az NKX2-3<sup>+</sup> sejtmagok százalékos arányát tekintve.

Az immunhisztokémiai elemzés során a sejtmagi DAB OD átlag értékek alapján az NKX2-3<sup>+</sup> sejteket gyengén, közepesen és erősen festődő csoportokba osztottuk (részletek az Anyag és módszer fejezetben). Ezt követően a különböző korcsoportokban összehasonlítottuk a gyengén, közepesen és erősen festődő sejtmagok arányát, ahol ezen sejtek számát a leszámolt NKX2-3 pozitív sejtek számához viszonyítottuk. Összességében elmondható, hogy mindegyik korcsoportban az erősen festődő sejtmagok aránya volt a legmagasabb, ez a dominancia csak a 15-20 éves korcsoportban bizonyult szignifikánsnak az azonos korcsoportban lévő közepesen ( $p=0,0079$ ) és gyengén ( $p=0,0079$ ) festődő sejtmagokhoz viszonyítva.

Az NKX2-3 transzkripció faktor jelenlétén túl meghatároztuk a mintáink H-score értékét is, mely a pozitívan festődő sejtek arányából és a festődés intenzitásából kalkulált együttes viszonyszám (pontos képlet az Anyag és módszertan fejezetben). Statisztikailag magasabb H-score értéket mértünk 0-3 éves korcsoportban az 50-80 éves korosztályhoz ( $p=0,0185$ ) hasonlítva.

Ezen eredményeink megerősítik korábbi megállapításunkat, miszerint az NKX2-3 fehérje immunhisztokémiai módszerrel kimutatható humán vastagbél szövettani mintákban (Vojkovic et al. 2018). Homogén eloszlást mutat a tunica mucosa és tunica muscularis rétegében. Mintáinkban domináns az erősen festődő sejtmagok jelenléte, továbbá a legmagasabb arányt és H-score értéket a 0-3 éves korcsoportban detektáltunk.

#### 4.2.2 Az NKX2-3<sup>+</sup> sejtek jellemzése

Korábbi kettős immunhisztokémiai eredményeink alapján, feltételeztük, hogy mind az endoteliális, mind a nem-endoteliális mezenchimális sejtek egy része termel NKX2-3 fehérjét. Célul tűztük ki az NKX2-3 transzkripció faktort expresszáló sejtek meghatározását a humán vastagbél mintákban. Mivel a korábbi vizsgálataink során a legerősebb NKX2-3 festődést a 0-3 éves korcsoportban mértük, további immunhisztokémiai vizsgálatainkat ezen mintáinkon végeztük el.

Az NKX2-3<sup>+</sup> mezenchimális sejtek további karakterizálása során az  $\alpha$ SMA-t expresszáló miofibroblasztokat vizsgáltuk (Adegboyega et al. 2002). Megerősítve korábbi megfigyelésünket, a perikriptális gyűrűben, a lamina propria mélyebb rétegeiben és a simaizom sejtekben is kimutatható az  $\alpha$ SMA expresszió, ugyanakkor az összefolyó festődési mintázat nem tette lehetővé a perikriptális régió pontosabb elemzését.

A sejtvonal meghatározás érdekében további mezenchimális markerekkel is végeztünk vizsgálatokat. Egerekben, a perikriptális mezenchimális gp38/podoplanin pozitív sejtek egy része hordozza a CD34 fehérjét is, mely az endotél sejtek felszínén ugyancsak jelen van (Stzepourginski et al. 2017). A CD34-antitesttel történő immunhisztokémiai jelölést követően a perikriptális régióban a non-vaszkuláris CD34<sup>+</sup> sejtek között mind NKX2-3<sup>+</sup>, mind NKX2-3

negatív sejteket sikerült azonosítani, melyek néha egymás szomszédságában helyezkedtek el. Morfometriai analízis során az NKX2-3<sup>+</sup> perikriptális sejtek 22.4%-a (234 sejt az 1045 sejtéből) expresszálja a CD34 fehérjét is, ugyanakkor a CD34 pozitív sejtek 75%-a (234 sejt a 312 sejtéből) NKX2-3<sup>+</sup>. A CD34<sup>+</sup> sejtek maradék 25%-a (78 sejt a 212 sejtéből) és a CD45<sup>+</sup> sejtek nem expresszáltak NKX2-3-at.

Irodalmi adatok alapján egérben a vaszkuláris-adhéziós fehérje (VAP-1/AOC3) megjelenik az NKX2-3<sup>+</sup> miofibroblasztokon (Hsia et al. 2016), egészséges humán colon szövettani mintákban pedig leírták a lamina propria és submucosa érkepletein, továbbá a lamina muscularis mucosae simaizom sejtjeiben. Kutatásunk következő lépéseként ezért megvizsgáltuk a VAP-1 és NKX2-3 expresszióját morfológiailag intakt humán vastagbél mintákon. A perikriptális régióban sikerült VAP-1/NKX2-3 kettősen pozitív sejteket kimutatnunk, továbbá a lamina propria mélyebb rétegeiben is jelentős VAP-1 festődés volt észlelhető. A perikriptális régióban a VAP-1<sup>+</sup> sejtek többsége expresszálta az NKX2-3 fehérjét is. Az NKX2-3/VAP-1 és az NKX2-3/CD34 közötti átfedés mértékének összehasonlítása azt mutatta, hogy az NKX2-3<sup>+</sup> sejtek között arányaiban több a VAP-1<sup>+</sup> (340 sejt a 669 sejtéből, 50,8%), mint a CD34. Statisztikai analízisünk arra enged következtetni, hogy a VAP-1 expressziója szorosabb kapcsolatban áll az NKX2-3 termeléssel, mint a CD34, mivel a VAP-1<sup>+</sup> sejtek csupán 5,1%-a (21 sejt a 361 sejtéből) NKX2-3<sup>-</sup>, míg a fentebb részletezett eredményeink alapján a CD34<sup>+</sup> sejtek 25%-a NKX2-3<sup>-</sup> ( $p < 0,0001$ ).

Az NKX2-3<sup>+</sup> mezenchimális sejtek további azonosítása érdekében kombinált jelölést végeztünk metszeteinken. Ennek során olyan antitest-koktél alkalmaztunk, melyben a CD34/VAP-1/ $\alpha$ SMA antitesteket piros színnel hívtuk elő, az anti-NKX2-3 antitestet DAB kromogén használatával barna színben tettük láthatóvá. A metszetek elemzése során azt tapasztaltuk, hogy az NKX2-3<sup>+</sup> sejtek túlnyomó többsége egyben CD34/VAP-1/ $\alpha$ SMA koktél pozitív is, de ugyanakkor jelen vannak olyan NKX2-3<sup>+</sup> sejtek, melyek a fenti koktél előhívása mellett továbbra is egyszerűen pozitívak maradtak. Az  $\alpha$ SMA festés értékelésénél megfigyelt kiterjedt jelölődéshez hasonlóan az NKX2-3 festéssel való átfedés számszerűsítésére tett próbálkozásaink is hiábavalóak voltak. Összeségében eredményeink azt mutatják, hogy bár a szövettanilag kimutatható NKX2-3<sup>+</sup> sejtek többsége a különféle perikriptális miofibroblaszt sejtvonalakhoz rendelhető, az alkalmazott markerek egyike sem képes egyedileg azonosítani az NKX2-3<sup>+</sup> sejteket. Emellett az NKX2-3<sup>+</sup> sejtek egy része nem mutat CD34/VAP-1/ $\alpha$ SMA pozitivitást.

#### **4.2.3 NKX2-3<sup>+</sup> sejtek elhelyezkedése és aránya pre-malignus és malignus vastagbél szövettani mintákban**

Korábbi vizsgálatok leírják, hogy az NKX2-3 gén polimorfizmusa hajlamosítja a gyulladással járó bélbetegségekre való fogékonyságra (Parkes et al. 2007), a gén hiánya pedig egerekben fokozott epiteliális osztódást eredményez mind homeosztatikusan, mind gyulladással járó állapotban (Kellermayer et al. 2019). Ezen eredmények alapján felmerül az NKX2-3 szerepe a fokozott epiteliális osztódással járó kórállapotokban, így polipok és tumorok kialakulásában. A továbbiakban pre-malignus adenomatosus polip és malignus adenocarcinomával érintett betegek vastagbél szövettani mintáit vizsgáltuk. Eredményeinket életkor-illesztetten a morfológiailag intakt 50-80 éves korcsoport eredményeivel vetettük össze.

Hasonlóan a nem-tumoros mintákhoz, mind a vastagbél polip, mind az adenocarcinoma mintákban a lamina propria/stróma rétegben diffúz NKX2-3 eloszlást tapasztaltunk. A vizsgált mintákban az NKX2-3<sup>+</sup> sejtmagok százalékos aránya az összes detektált sejtmaghoz viszonyítva a morfológiailag intakt kontroll csoportban volt a legmagasabb, mely különbség szignifikánsnak bizonyult a morfológiailag intakt-polip ( $p = 0,0433$ ), valamint a morfológiailag

intakt-tumoros ( $p=0,0003$ ) összehasonlításokban. A polip és tumoros minták közötti különbség nem érte el a szignifikáns szintet.

Ezt követően vizsgáltuk, hogy a látott NKX2-3 expressziós szint csökkenés egységesen érinti-e a különböző intenzitással festődő sejteket, ezért mintáinkat a DAB OD átlag értékek alapján is elemeztünk. A tumoros mintákban a gyengén festődő sejtek voltak a legnagyobb számban jelen. Ezen gyengén festődő sejtek százalékos aránya az összes NKX2-3<sup>+</sup> sejthez viszonyítva szignifikánsan megnövekedett a morfológiailag intakt kontrollhoz ( $p=<0,0001$ ) képest, ami a mérsékelten és erősen festődő NKX2-3<sup>+</sup> sejtmagok számának jelentős csökkenésével párosult. A morfológiailag intakt mintáknál ennek az ellenkezőjét figyelhettük meg, ahol az erősen festődő sejtek voltak legnagyobb számban jelen.

Az epitel sejtek rétegében a tumoros és polipos elváltozást tartalmazó mintákban sem volt kimutatható az NKX2-3 transzkripciós faktor. A minták H-score értékét tekintve, mind a polip, mind a vastagbél tumoros mintákban szignifikánsan alacsonyabbnak ( $p=0,0288$ ,  $p=<0,0001$ ) bizonyult a morfológiailag intakt mintákhoz képest. A tumoros minták H-score értéke statisztikailag alacsonyabb ( $p=0,0096$ ) volt a polippal érintett mintákhoz viszonyítva is.

Eredményeink alapján összességében elmondható, hogy az adenomatosus polip és adenocarcinoma elváltozásokat tartalmazó mintáinkban az erősen festődő NKX2-3 sejtek száma nagymértékben csökkent.

## 5. Megbeszélés

PhD munkám során az Nkx2-3 transzkripció faktor lép vörös pulpa organizációjában betöltött szerepét, valamint a hiányában megjelenő LYVE-1 pozitív ér képződmények eredetét vizsgáltam. Különböző korcsoportokba tartozó intakt vastagbél szövettani metszeteken elemeztem az NKX2-3 fehérje expresszióját, továbbá kísérleteket végeztünk az NKX2-3<sup>+</sup> stróma sejtek fenotípusos meghatározására. Irodalmi adatok alapján az NKX2-3<sup>+</sup> stróma sejteknek szerepe van az intesztinális őssejtek mikro környezetének kialakításában, ezért az intakt szövettani mintákból származó eredményeinket összehasonlítottuk pre-malignus és malignus elváltozásokból származókkal.

Jelen munkánk igazolja az Nkx2-3 transzkripció faktor hiányában megjelenő Prox1<sup>+</sup> ektópiás nyirokér kapillárisok jelenlétét egér lépben, melyhez károsodott stromális szerkezet és stressz hemopoezis társul. Ezen megfigyelések megerősítik, hogy az Nkx2-3 fontos szerepet tölt be mind a szövet-specifikus nyirok- és vérér endotél elköteleződésben, mind a lép stressz vérképzésében.

A splanchnicus mezenchima szétválását követően a fejlődő lép előtelep speciális stróma elemei és helyi makrofág csoportjai az érrendszer köré rendeződnek, ami az érelemek szövet-organizáló szerepére utal (Steiniger et al. 2007, Bellomo et al. 2021). A lép stróma sejtjein végzett scRNA szekvenálási vizsgálatok rávilágítottak a kötőszöveti sejtek strómán belül elfoglalt helyének, és különböző funkcióinak szerepére, különösképpen a fehér pulpa retikuláris fibroblaszt sejtcsoportban (Cheng et al. 2019, Alexandre et al. 2022). Ezek az elemzések a lép különböző kompartmentjeinek stromális összetételére, valamint sejt-differenciációs útvonalainak feltérképezésére fókuszálnak, ezáltal igazolva, hogy a vérér endotél sejtek is nagy heterogenitást mutatnak mind fenotípusukban, mind kemokin és addresszin mintázatukban (Balázs et al. 2001, Berahovich et al. 2014, Tadayon et al. 2019). A mély efferens nyirokerek jelenlétét egerekben kimutató korábbi megfigyelések ellenére (Pellas and Weiss 1990, Steiniger and Barth 2000) a feltételezett lép LEC-ek eredetére és funkcióira vonatkozó elemzések ritkák. Ezeknek a lép nyirokereknek a pontos eredete (az általánosan használt nyirokér markerekkel [LYVE-1, gp38/podoplanin, Prox1]) emberben jelenleg nem ismert, valószínűleg az egyéb limfoid szövetekkel (nyirokcsomók, Peyer-plakkok, bél nyirokerek) szemben sokkal kevésbé nyilvánvaló jelenlétük miatt.

A lép stróma és neki megfelelő nyirokcsomó kompartmentek scRNA-szekvenálási adatainak összehasonlítása alapján az Nkx2-3 a lépre leginkább jellemző gének egyike (Steiniger and Barth 2000). Az mRNS expressziós mintázat vizsgálata alapján a fehér pulpa retikuláris sejtcsoportjai mellett az Nkx2-3 mRNS kimutatható legalább nyolc különféle mezenchimális alcsoportban, többek között a marginális zóna vaszkuláris eredetű adventitialis sejtjeiben, pericitáiban, valamint mezoteliális sejtjeiben. Ezzel szemben a vörös pulpa stromális elemei kisebb fokú diverzitást mutatnak, holott a lép stromális szerkezetének jelentős részét teszik ki. A nyilvános adatbázis ([http://muellerlab.mdhs.unimelb.edu.au/frc\\_scrnaseq/](http://muellerlab.mdhs.unimelb.edu.au/frc_scrnaseq/)) elemzése alapján a vörös pulpában az Nkx2-3 csak kis mértékben van jelen.

Az intézetünkben folytatott korábbi immunhisztokémiai vizsgálatokkal humán lép mintákban csak a vörös pulpa endotél sejtjeiben sikerült kimutatni az NKX2-3 transzkripció faktor jelenlétét (Kellermayer et al. 2016). Ez az eloszlás megfeleltethető az IBL-9/2 mAb által Nkx2-3 hiányos egerek lépében kimutatott nagymértékű vörös pulpa érhalózat csökkenésnek, és a Stab1 gén által termelt Clever1 fehérje megjelenésének. A legújabb átfogó expressziós elemzések kimutatták, hogy az Nkx2-3 mRNS szelektíven expresszálódik a lép, a vékonybél és a vastagbél vaszkuláris endotél sejtjeiben (Kalucka et al. 2020). Érdekes azonban, hogy a lép különböző vaszkuláris szegmenseinek vizsgálata során sem az Nkx2-3, sem a Stab1 nincs benne az 50 leggyakrabban előforduló génben, viszont a Prox1 szerepel köztük, a LYVE-1

említése nélkül. Jelen eredményeink bizonyítják, hogy Nkx2-3 hiányában a vörös pulpa vérereket nagyrészt ektópiás Prox1-pozitív nyirokcapillárisok váltják fel, ami azt jelzi számunkra, hogy az Nkx2-3 meghatározó szerepet játszik a lép vaszkuláris mintázatában, beleértve a nyirokendotél versus vérendotél elköteleződést.

Mi lehet a vörös pulpa vérrendszer Nkx2-3 hiányában bekövetkező nyirokcapilláris irányú transzdifferentiálódásának magyarázata? A bél limfoid szöveteinek HEV-jeiben az Nkx2-3 aktiválja a MAdCAM-1 addresszin promóterét azáltal, hogy a DNS-kötő csirke ovalbumin 5' vég felőli promóterhez kötődő transzkripciós faktor II (COUP-TFII) árva magreceptorral együtt egy összetett transzkripciós elemet képez (Dinh et al. 2022). A COUP-TFII egy, a véna identitás szempontjából meghatározó jelentőségű transzkripciós faktor, mely hatását a Notch aktivitás elnyomása révén fejt ki (You et al. 2005). Ehhez elengedhetetlen, hogy a HEV-programozott vénás endotél sejtekben a MAdCAM-1 addresszin promóter régióján belül egyidejűleg mind az Nkx2-3, mind a COUP-TFII kötőhelyei elérhetőek legyen. Mivel a Prox1 a vénás endotél sejteken is kifejt LEC-meghatározó aktivitását (Dinh et al. 2022), feltételezhető, hogy hasonló kettős szabályozás megy végbe a lépben, ahol az Nkx2-3 gátolhatja a Prox1 expressziót, míg a COUP-TFII továbbra is biztosítja a véna irányú specifikációt. Ennek megfelelően a promóter adatbázisban (<https://epd.epfl.ch>) végzett keresés alátámasztja az Nkx2-3 és a COUP-TFII lehetséges kötőhelyeinek jelenlétét a Prox1 promóter régióban. Annak tisztázása, hogy az Nkx2-3 a COUP-TFII-vel közösen (tehát véna specifikus módon) befolyásolhatja-e a Prox1 kifejeződést további vizsgálatok tárgyát képezi. Az eddigi eredmények arra engednek következtetni, hogy az Nkx2-3 hiánya a vénás szinusz endotél sejt elköteleződést LEC- irányba tolja, illetve, a posztnatális vér endotél addresszin mintázat eltolódását eredményezi MAdCAM-1-ről PNAd-re a limfocita akkumuláció során (Mebius et al. 1996, Balázs et al. 2001, Balogh et al. 2007, Zindl et al. 2009).

Ennek az eltolódásnak a funkcionális következményeit illetően mind az eritroid, mind a megakariocita vonal mentén az extramedulláris hemopoézis jelentős károsodását figyeltük meg normál és stressz indukált hemopoézis során egyaránt. A fenotípusos elemzések a nem-endoteliális CD29<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>gp38<sup>+</sup>Thy-1.2<sup>+</sup>CD51<sup>+</sup> lép stróma sejtek jelenlétét jelzik, amelyek vad típusú egerekben is jelen vannak, és fontosak a vörös pulpa vérképző funkciójában (Lim and O'Neill 2019). A kísérleti állatok véreztetését követően mind a vad típusú, mind az Nkx2-3 KO egerekben fokozott csontvelői vörösvértestképzést figyeltünk meg, mely eredmények arra engednek következtetni, hogy az Nkx2-3 hiánya nem a hemopoetikus őssejtek károsodása által vezet az extramedulláris vérképzés csökkenéséhez. A vörös pulpa szinusz endotél sejtjei megfelelő mikrokörnyezetet biztosítanak a hemopoetikus őssejtek számára (Kiel et al. 2005), ezért a lép károsodott vérképzésében a vörös pulpa szinusz endotél sejtjeinek eltérései (amire a Clever1 és IBL9/2 festődés hiánya is enged következtetni) kritikus fontossággal bírhatnak. A lép makrofágok, beleértve a MARCO-pozitív marginális zóna makrofágokat, a CD169<sup>+</sup> metallofil makrofágokat (mint két fő marginális zóna rezidens makrofág-alcsoportot), valamint az F4/80<sup>+</sup> vörös pulpa monocitákat/makrofágokat, szintén elősegíthetik az extramedulláris vérképzést a stresszválasz során (Lévesque et al. 2021). Mivel az Nkx2-3 mutáns lépben ezekből a sejtekből kevés van jelen (Pabst et al. 1999, Wang et al. 2000), feltételezhető, hogy az alaphelyzetben is megfigyelhető anaemia és károsodott extramedulláris vérképzés ezeknek a sejteknek az alacsony számához is köthető. A makrofágok hiánya mellett a csökkent lép hemopoézis a kialakult LEC jelenlétével is összefügghet, mivel újabb eredmények szerint a Prox1 kifejeződés elnyomja az endotél sejtek vérképző képességét (Kazenwadel et al. 2023). Ahhoz, hogy Nkx2-3 hiányos és vad típusú egerekből különböző meghatározott stromális alcsoportokat izoláljunk, elemezzük összetételüket, valamint génexpressziós mintázatukat, további kísérletekre van szükség.

Összességében eredményeink alátámasztják az Nkx2-3 transzkripciós faktor hiányában az egerek lépében ektópiás nyirokkapillárisokat képező gp38<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/Prox1<sup>+</sup>/ LEC sejtek jelenlétét, mely a vörös pulpa érrendszerének károsodásával, a Clever1<sup>+</sup>, és az IBL-9/2<sup>+</sup> szinusz endotél sejtek hiányával társul. A vörös pulpa vaszkuláris mintázatának eltolódása hibás extramedulláris vérképzéshez vezet, mely egyensúlyi állapotban krónikus anémiaként, továbbá csökkent stressz vérképzésben és károsodott megakariocita expanszióban nyilvánul meg. Mindezen eredmények együttesen mutatják az Nkx2-3 transzkripciós faktor lép vörös pulpa vaszkuláris identitásának és funkcionalitásának kialakításában betöltött komplex szerepét.

Kutatómunkánk második felében az NKX2-3 előfordulását vizsgáltam különböző korú intakt humán szövettani vastagbél mintákon. Eredményeink az NKX2-3 heterogén eloszlását, endoteliális és stróma sejtcsoportokban való kifejeződését mutatják, termelődését befolyásolja mind az életkor, mind a rosszindulatú elváltozás jelenléte. Elemzéseink alapján a legfiatalabb korcsoportban a legkifejezettebb az NKX2-3 expressziója, ami feltehetőleg az ebben az időszakban tapasztalható szervi növekedést tükrözi. A reaktivitás nagyrészt a vastagbél subepiteliális régiójában, a lamina propriában figyelhető meg, ahol a sejtek egyidejű expressziót mutatnak a CD34,  $\alpha$ SMA és a VAP-1 mezenchimális stróma markerekkel.

Az NKX2-3 endoteliális kifejeződése szükséges lehet a bél kapilláris-hálózat szerveződésének fenntartásához, mivel az öröklött mutációja bizonyítottan összefüggésbe hozható a bélvarixok kialakulásával (Kerkhofs et al. 2020). Korábbi in vitro kísérletek során az NKX2-3 gátlása ileális mikrovaszkuláris endotél sejtekben a MAdCAM-1, protein kináz B (AKT) és VCAM-1 sejtfelszíni molekulák mRNS expressziójának csökkenéséhez vezetett (Yu et al. 2011). Ezek a megfigyelések endoteliális hatásokat, valamint lehetséges kommunikációs kapcsolódási folyamatokat feltételeznek más sejtekkel, többek között a fehérvérsejtekkel, melyek hozzájárulhatnak az NKX2-3 expresszió megváltozásához és a gyulladással járó bélbetegségek kialakulása közötti kapcsolathoz (Parkes et al. 2007). Az eger Peyer-plakk magas endoteliális vénuláiban az NKX2-3 endoteliális hatása tulajdonképpen egy transzkripciós módosítást jelent, ezáltal befolyásolva a MAdCAM-1 addresszin és a béta-galaktozid alfa 2,6 szialil transzferáz 1 (St6Gal1) enzim expresszióját, ami meghatározza a MAdCAM-1 addresszin glikolizációs jellemzőit (Dinh et al. 2022). Az NKX2-3 a hemopoetikus őssejtekben is kifejeződik, befolyásolva azok homeosztázisát, az érett leukocitákban viszont nincs jelen, melyet immunhisztokémiai megfigyeléseink is alátámasztanak. Az NKX2-3 hiánya a Peyer-plakkok és az izolált limfoid folliculusok fejlődésének károsodását eredményezi, ez az eltérés valószínűleg az endotél specifikáció zavarával függ össze, mely hatással van a bél immunitásra is. Ezzel szemben a DSS által kiváltott vastagbélgyulladásban betöltött protektív szerepe valószínűleg a non-endoteliális sejteknek tudható be (Pabst et al. 2000, Wang et al. 2000, Kellermayer et al. 2019).

Míg az NKX2-3 vénás endoteliális expressziója befolyásolhatja a fehérvérsejtek bélbe való bejutását és a gyulladással járó válaszokat, addig a lamina proprián belül a nem-endoteliális NKX2-3 termelés valószínűleg a vastagbél epiteliális sejtek differenciálódásához járul hozzá azáltal, hogy megfelelő mikrokörnyezetet hoz létre az Lgr5<sup>+</sup> intesztinális epiteliális őssejtek számára (Barker et al. 2007, Hsia et al. 2016). Az NKX2-3 pozitív vastagbél stróma sejtek származását célzó további elemzéseink során következetesen azt találtuk, hogy immunhisztokémiai módszerrel a vastagbélhámsejtek nem expresszálnak kimutatható mennyiségű NKX2-3 fehérjét, másrészt, a nem-endoteliális lamina propria CD34,  $\alpha$ SMA és/vagy VAP-1 pozitív stróma sejtek jelentős része termel NKX2-3 transzkripciós faktort. Ez az elhelyezkedés hasonló az egerekben látottakhoz, ahol a Wnt2b-t, Germlin-1-et és R-spondin1-et termelő CD34<sup>+</sup>/gp38<sup>+</sup> perikriptális mezenchimális sejtek közelsége fő tényezőnek tűnik az Lgr5<sup>+</sup> ISC-k homeosztázisának fenntartásában szövetkárosodást és gyulladást követően (Stzepourginski et al. 2017). Az NKX2-3<sup>+</sup> sejtek eltérő mértékű előfordulása a VAP-1 pozitív és CD34 pozitív



perikriptális sejtek között, továbbá figyelembe véve az összes NKX2-3<sup>+</sup> sejtmag és a VAP-1 valamint CD34 expresszió összege közti különbséget, a VAP-1 és a CD34 kifejeződés részleges átfedésére és VAP-1<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/NKX2-3<sup>+</sup> sejtek jelenlétére utal. Ezen stromális alcsoportok elkülönítésében a CD31, CD34, VAP-1 sejtfelszíni markerekkel végzett jelölések NKX2-3 expresszióval való összehasonlítása segítséget nyújthat. Ez a megközelítés arra enged következtetni, hogy létezik egy feltételezett „három negatív” (CD34<sup>-</sup>/VAP-1<sup>-</sup>/αSMA<sup>-</sup>) de NKX2-3<sup>+</sup> minor populáció, amelyet kombinált immunhisztokémiai jelölésünk eredménye is alátámaszt. A közelmúltban megjelent scRNA szekvenálási eredmények megerősítik megfigyelésünket, mely szerint az NKX2-3 expresszió nem köthető egy bizonyos sejtvonalhoz. Az adatbázis alapján az NKX2-3 többek között jelen van a miofibroblasztokban, továbbá az ADAMDEC<sup>+</sup>, CCL11<sup>+</sup> és koleszterin 25-hidroxiláz (CH25H)<sup>+</sup> stróma sejtekben is (Elmentaite et al. 2021) (<https://www.gutcellatlas.org/>). Az endotél sejtek csoportján belül a Ki67<sup>+</sup> endotél sejtekben és a kapilláris endotél sejtekben sikerült NKX2-3-at kimutatni, de a nyirokendotél sejtekben nem.

Vizsgálataink utolsó szakaszában tanulmányozott adenomatosus polip és adenocarcinomás (CRC) mintákban az NKX2-3 kifejeződés csökkenését észleltük. Ez felveti a kérdést, hogy a tumoros sejtek expanziója képes-e megváltoztatni a tumor asszociált fibroblasztok (CAF) transzkripciós profilját, vagy az NKX2-3 kezdeti csökkenése teremt-e kedvező környezetet a CRC kialakulásához. Az NKX2-3 jelölődés csökkenése a stróma sejtek általi csökkent termelésre, vagy azok részleges helyettesítésére utal olyan sejtek által, melyekből eredetileg is hiányzott az NKX2-3. Bár a különböző vastagbélszakaszok és/vagy rectum NKX2-3 mRNS és fehérje expressziója közötti különbségek hatása nem zárható ki, a normál és tumoros vastagbél mintákat tartalmazó Gene Expression Omnibus adatbázis (GSE44076; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE44076>) alapján, nincs szignifikáns különbség a jobb és bal colonefélből származó normál minták NKX2-3 expressziós szintjében, ugyanakkor a tumoros mintákban a fehérje szignifikánsan alacsonyabb mértékben detektálható. Korábbi kísérleteinkben NKX2-3 KO egerek DSS indukált vastagbélgyulladásában megfigyelt fokozott epiteliális proliferáció és intesztinális regeneráció (Kellermayer et al. 2019) összeegyeztethető az NKX2-3 expressziója és a hámsejtek expanziója közötti negatív kapcsolattal. Annak tisztázása, hogy az NKX2-3 hiánya fokozza-e ezekben az egerekben a CRC kialakulására való hajlamot, további kutatások tárgyát képezi. Amint fentebb részleteztük, a CD31 (mint endoteliális marker), a CD34 és a VAP-1 (mint endoteliális és mezenchimális marker) kombinációinak felhasználása segítséget nyújthat későbbi sejtszeparálási vizsgálatokban, melyek során pontosabb eredményt kaphatunk az NKX2-3 expressziójára vonatkozóan normál, polip és CRC-s mintákban. Viszont még egyelőre nem ismert, hogy a különböző CRC-vel kapcsolatos mutációk (pl. a KRAS, NRAS, BRAF) (Božyk et al. 2022), vagy a fibroblaszt aktiváló fehérje (FAP) termelése (Kalaei et al. 2023) módosíthatják-e vagy korrelálhatnak-e az NKX2-3 expressziójával. Ezen túlmenően a különböző progressziójú tumoros betegek nyomon követése valamint nagyobb elemszámú vizsgálat tovább pontosíthatja a FAP<sup>+</sup> CAF sejtek eltérő NKX2-3 expressziójára vonatkozó adatainkat. A non-invazív adenomatosus polip szövettani mintákban már megfigyelhető az NKX2-3 csökkenése, ezért valószínűnek tartjuk, hogy az NKX2-3 kifejeződés csökkenése a későbbiekben elősegíti a CRC transzformált sejtek kialakulásához megfelelő környezet létrejöttét, és azok expanzióját. Az NKX2-3 sejtvonal-specifikus inaktiválásával végzendő későbbi vizsgálatok fontos támpontokat adhatnak ennek a mezenchimális transzkripciós faktornak a hám eredetű vastagbél rosszindulatú daganatok terjedésében betöltött szerepére vonatkozóan.

## 6. Új eredmények rövid összefoglalása

- **Milyen eredetűek a lépben Nkx2-3 hiányában megjelenő LYVE-1 pozitív zsákszerű képződmények?**
  - A Prox1<sup>GFP</sup>-Nkx2-3 mutáns egerek lépben kiterjedt Prox1-pozitív, elágazásokat és anasztomózisokat létrehozó hálózatot detektáltunk, mely a Prox1<sup>GFP</sup>-Nkx2-3 heterozigóta egerek lépében nem volt jelen.
  - Prox1<sup>GFP</sup>-Nkx2-3 mutáns egerek lépének áramlási citometriával történő vizsgálatával megerősítettük a mutáns lépekben ektópiásan megjelenő kapilláris-hálózat nyirokendotél (LEC) eredetét.
- **Az ismert szerkezeti eltéréseken kívül milyen hatással van az Nkx2-3 hiánya a lép vörös pulpa szinusz endotél sejtjeire?**
  - Vad típusú egerek mintáiban a Clever1 nagyrészt átfedést mutat az IBL-9/2 jelöléssel. Nkx2-3 hiányában a lép vörös pulpa szinusz endotél sejtjeinek IBL-9/2 reaktivitása, és Clever1 fehérje expressziója nem mutatható ki, míg Stab1<sup>-/-</sup> egerek lépmintáinak IBL-9/2 antitesttel történő vizsgálata során a vörös pulpa szinusz hálózatának mintázata épnek bizonyult.
- **Milyen hatással van az extramedulláris vörösvértestképzésre az Nkx2-3 hiánya?**
  - Az Nkx2-3 hiányos egerek lépében stromális és vaszkuláris CD29<sup>+</sup>/VCAM-1<sup>+</sup> sejtek jelen vannak, a vörös pulpa fragmentált szerkezetet mutat, a vörös pulpa-fehér pulpa közötti egyértelmű határvonal megléte nélkül.
  - Kezeletlen Nkx2-3 KO egerekben krónikus anaemia áll fenn, az EPO szint szignifikánsan magasabb a kontroll csoporthoz képest, ami nem elegendő a normál hematokrit érték fenntartásához. Kezelést követően Nkx2-3 KO egerekben az EPO szint jelentősen meghaladta a kezelt BALB/c egereket, de nem elegendő a stressz eritropoezis indukálásához.
  - Nkx2-3 hiányában a lépben TER119<sup>+</sup> eritrociták kimutathatók, az eritroid sejtek gyakorisága és száma is alacsonyabb a kontrollhoz képest. Kezelést követően az eritroid sejtek száma és a TER-119<sup>+</sup> terület nem növekszik, de a CD29<sup>+</sup> extravaszkuláris retikuláris sejtek jelen vannak. Nkx2-3 hiányában a lép nem képes növelni eritropoetikus aktivitását, mely szövet-specifikus eritropoetikus funkció károsodására utal.
  - Kezelést követően mind a vad típusú, mind az Nkx2-3 KO egerekben fokozott csontvelői vérképzés indukálódik, ezért feltételezhető, hogy az Nkx2-3 hiánya a nem hemopoetikus őssejtek károsodása által vezet a vérképzés csökkenéséhez.
- **Az Nkx2-3 hiányában fennálló károsodott extramedulláris vérképzés befolyásolja-e a lépben a megakariociták előfordulását és azok expanszióját?**
  - Kezeletlen BALB/c egerekben a megakariociták a szubkapszuláris rétegben és a vörös pulpa mélyebb régióiban helyezkedtek el egyesével, vagy kisebb csoportokat alkotva, míg Nkx2-3 hiányában csak elszórtan vannak jelen.
  - A TPO-agonista kezelés a vad típusú lépben a trombociták számának jelentős növekedéséhez vezet, míg Nkx2-3 hiányában csak kismértékű növekedés tapasztalható.
  - Nkx2-3 hiányos egerek lépében a megakariociták csökkent számban vannak jelen, és nem képes ezen populáció számát növelni TPO-agonista kezelés hatására, szemben a BALB/c egerekkel.

- **Van-e különbség az NKX2-3 transzkripciós faktor expressziójában különböző korcsoportú morfológiailag intakt humán colon szövettani mintákban?**
  - Az NKX2-3 fehérje immunhisztokémiai módszerrel kimutatható humán vastagbél szövettani mintákban.
  - Az NKX2-3 homogén eloszlást mutat a tunica mucosa és tunica muscularis rétegében.
  - Az NKX2-3 fehérje expressziójának mértéke és H-score értéke eltérő a különböző korcsoportokban.
  - A legfiatalabb korcsoportban a legkifejezettebb az NKX2-3 expressziója.
  
- **Mely stromális elemhez/elemekhez köthető az NKX2-3 fehérje expresszió humán vastagbélben?**
  - A perikriptális régióban a non-vaszkuláris CD34<sup>+</sup> sejtek túlnyomó többsége NKX2-3<sup>+</sup>.
  - A perikriptális régióban a VAP-1<sup>+</sup> sejtek többsége expresszálja az NKX2-3 fehérjét is.
  - Az NKX2-3<sup>+</sup> sejtek között arányaiban több a VAP-1<sup>+</sup> sejt, mint a CD34<sup>+</sup>. A VAP-1 expressziója szorosabb kapcsolatban áll az NKX2-3 termeléssel, mint a CD34.
  - NKX2-3<sup>+</sup> sejtek túlnyomó többsége CD34/VAP-1/ $\alpha$ SMA pozitív, ugyanakkor jelen vannak olyan NKX2-3<sup>+</sup> sejtek, melyek a fenti fenotípus jellemzők egyikét sem mutatják.
  - A szövettanilag kimutatható NKX2-3<sup>+</sup> sejtek többsége a perikriptális miofibroblaszt sejtvonalhoz tartozik.
  
- **Változik-e az NKX2-3 expresszió pre-malignus és malignus humán vastagbél folyamatokban?**
  - Mind a vastagbél polip, mind az adenocarcinoma mintákban a lamina propria/stróma rétegben kimutathatók NKX2-3<sup>+</sup> sejtek.
  - A vizsgált mintákban a morfológiailag intakt kontroll csoportban volt a legmagasabb az NKX2-3<sup>+</sup> sejtmagok aránya, mely különbség szignifikáns a morfológiailag intakt-polip, valamint a morfológiailag intakt-tumoros csoportokkal összehasonlítva.
  - Mind a polip, mind a tumor mintákban a gyengén festődő NKX2-3 sejtek vannak a legnagyobb számban jelen, ami a mérsékelten és erősen festődő NKX2-3<sup>+</sup> sejtmagok számának jelentős csökkenésével párosul.
  - Az epitel sejtek rétegében a tumoros és polipos elváltozást tartalmazó mintákban az NKX2-3 nem mutatható ki.

## 7. Publikációk, előadások listája

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

**Gábris, F.**, G. Kiss, B. Szirmay, Á. Szomor, G. Berta, Z. Jakus, Z. Kellermayer, and P. Balogh. 2023. Absence of Nkx2-3 induces ectopic lymphatic endothelial differentiation associated with impaired extramedullary stress hematopoiesis in the spleen. *Front Cell Dev Biol* 11: 1170389. **IF:5,5**

**Gábris, F.**, B. Kajtár, Z. Kellermayer, and P. Balogh. 2023. Quantitative analysis of Nkx2-3 expression in human colon – an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem*: 221554231217336

### Egyéb kapcsolódó közlemények

Vojkovic, D., Z. Kellermayer, **F. Gábris**, A. Schippers, N. Wagner, G. Berta, K. Farkas, and P. Balogh. 2019. 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* 10: 366 **IF:5,085**

Dinh, T. T., M. Xiang, A. Rajaraman, Y. Wang, N. Salazar, Y. Zhu, W. Roper, S. Rhee, K. Brulois, E. O'Hara, H. Kiefel, T. M. Dinh, Y. Bi, D. Gonzalez, E. P. Bao, K. Red-Horse, P. Balogh, **F. Gábris**, B. Gaszner, G. Berta, J. Pan, and E. C. Butcher. 2022. An NKX-COUP-TFII morphogenetic code directs mucosal endothelial addressin expression. *Nat Commun* 13: 7448. **IF:16,6**

### Egyéb közlemények

**Gábris Fanni**, Xinkai Jia, Gajdócsi Erzsébet Emília, Kellermayer Zoltán, Balogh Péter. 2020. A nyirokcsomóstroma immunológiai szerepe – többen, többet. *Immunológiai szemle*

Jia, X., G. Berta, **F. Gábris**, Z. Kellermayer, and P. Balogh. 2020. Role of adipose-associated lymphoid tissues in the immunological homeostasis of the serosal surface. *Immunol Lett* 228: 135-141. **IF:3,685**

Jia, X., **F. Gábris**, Ó. Jacobsen, G. Bedics, B. Botz, Z. Helyes, Z. Kellermayer, D. Vojkovic, G. Berta, N. Nagy, Z. Jakus, and P. Balogh. 2020. Foliate Lymphoid Aggregates as Novel Forms of Serous Lymphocyte Entry Sites of Peritoneal B Cells and High-Grade B Cell Lymphomas. *J Immunol* 204: 23-36 **IF:5,422**

Khanfar, E., K. Olasz, **F. Gábris**, E. Gajdócsi, B. Botz, T. Kiss, R. Kugyelka, T. Berki, P. Balogh, and F. Boldizsár. 2020. Ameliorated Autoimmune Arthritis and Impaired B Cell Receptor-Mediated Ca<sup>2+</sup> Influx in Nkx2-3 Knock-out Mice. *Int J Mol Sci* 21. **IF:5,924**

## **8. Köszönetnyilvánítás**

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

Elsősorban témavezetőimnek Prof. Dr. Balogh Péternek és Dr. Kellermayer Zoltánnak szeretnék köszönetet mondani tudományos diákköri, majd PhD hallgatói éveim során nyújtott támogatásukért, útmutatásukért.

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

Köszönöm Dr. Kajtár Bélának, aki a humán vizsgálatok során volt segítségemre a minták kiválasztásában és elemzésében.

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

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

Munkám az alábbi támogatások segítségével valósult meg:

OTKA- #K108429

EFOP-3.6.1-16-2016-00004

FIKP- Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (FIKP II)

TKP-2020-4.1.1.-TKP2020

Romhányi György Szakkollégium