

**AZ NKX2-3 TRANSZKRIPCIÓS 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

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	7
1.1 A gyulladáshoz vezető tényezők.....	7
1.1.1 Genetikai és környezeti tényezők szerepe IBD kialakulásában.....	7
1.1.2 A mikrobiom és a barrier szerepe.....	9
1.1.3 Immunválasz eltolódás.....	10
1.1.4 Állatmodellek.....	11
1.2 A bél-asszociált nyirokszövetek fejlődésbiológiai jellemzői.....	12
1.2.1 Mezentériális nyirokcsomó.....	13
1.2.2 Peyer plakk.....	14
1.2.3 Colon plakk.....	15
1.2.4 Indukált GALT fejlődés: Szoliter intesztinális nyirokszövetek (SILT).....	15
1.3 Az ILC sejtek jelentősége és alcsoportjaik jellemzői.....	16
1.4 Az Nkx2-3 transzkripciós faktor.....	19
2. Célkitűzés	24
3. Anyagok és módszerek	25
3.1 Kísérleti állatok.....	25
3.2 DSS kezelés.....	25
3.3 Antitestek és reagensek.....	25
3.4 Lamina propria limfocita izolálás.....	26
3.5 Áramlási citometria.....	27
3.6 Szövetten.....	27
3.7 B-sejt-kolónia analízis teljes vastagbél biolumineszcenciával.....	29
3.8 Immunizálás és ELISA.....	29
3.9 RNS izolálás, cDNS írás, RT-PCR.....	30
3.10 Szérum IL-22 mérés.....	30
3.11 Anti-IL-22 kezelés.....	30
3.12 Csontvelő kimérák előállítása.....	31
3.13 Kombinált LacZ/ β -galaktozidáz enzim és immunhisztokémia.....	31
3.14 Statisztikai analízis.....	31
4. Eredmények	32
4.1 Posztinatális lamina propria ILC3 megoszlás Nkx2-3 hiányában.....	32

4.2 A posztnatális SILT-érés kinetikája Nkx2-3 hiányában	34
4.3 Posztnatális ILC3 megoszlás és vaszkuláris adresszin expresszió kapcsolata a bélben	37
4.4 PNAd core protein és módosító enzim mRNS expresszió eltérései Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányában	39
4.5 Megtartott perifériás nyirokcsomó szerkezet és normál T-dependens antitest válasz Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányában	41
4.6 Nkx2-3 hiányában a SILT érés részlegesen gátolt felnőtt korban	42
4.7 Felnőttkori colon ILC3 megoszlás Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányában normál és gyulladásos körülmények között	46
4.8 Nkx2-3 hiányos egerek védettek a DSS indukálta colitisszel szemben	47
4.9 Nkx2-3 hiányában a bélgyulladással szembeni védettség IL-22 független	51
4.10 Nkx2-3 hiányában nem-hematopoetikus sejtek révén alakul ki a colitis elleni védettség.....	53
5. Megbeszélés	55
6. Új eredmények összefoglalása.....	60
7. Publikációk, előadások listája.....	63
8. Irodalomjegyzék.....	65
9. Köszönetnyilvánítás	77
10. Mellékletek	78

Rövidítések jegyzéke

AHR: aryl hydrocarbon receptor

ATG16L1: autofágia-függő fehérje 16-1

CCL11: kemokin ligand 11

CCL19: kemokin ligand 19

CCL21: kemokin ligand 21

CCL7: kemokin ligand 7

CD: Crohn betegség

CEACAM6: karcinoembrionális antigén függő sejt adhéziós molekula 6

cILC3: 3-as típusú veleszületett (innate) limfoid sejt a colonban

ColP: colon plakk

CP: kriptoplakk

CXCL1: kemokin (C-X-C motif) ligand 1

CXCL13: kemokin (C-X-C motif) ligand 13

DC: dendritikus sejt

DSS: dextrán nátrium szulfát

E. coli: Escherichia coli

EC: epitelsejt

FDC: folliculáris dendritikus sejt

FoxP3: forkhead box P3 transzkripció faktor

GALT: bél-asszociált nyirokszövetek

GlyCAM-1: glikoziláció-dependens sejt adhéziós molekula-1

GWAS: teljes genomasszociációs vizsgálat

HEV: magas endotelű venula

HLA-DRB1: humán leukocita antigén II-es osztály, DRB1 béta lánc

IBD: gyulladássos bélbetegség

ICAM-1: intercelluláris adhéziós molekula-1

Id2: DNS-kötő fehérje inhibitor 2

IFN γ : interferon gamma

Ig: immunglobulin

IL: interleukin

ILC: veleszületett (innate) limfoid sejt

ILC3: 3-as típusú veleszületett (innate) limfoid sejt

ILF: izolált nyiroktüsző
imILF: éretlen izolált nyiroktüsző
IRGM: immunitás-függő GTPáz család M fehérje
ISC: intesztinális őssejt
JAK2: janus kináz 2
LP: lamina propria
LTi: limfoid szövet indukáló sejt
LTin: limfoid szövet iniciátor sejt
LTo: limfoid szövet organizáló sejt
LT $\alpha\beta$ 2: limfotoxin alfa béta 2
LYVE1: nyirokér endotél hialuronan receptor 1
mAb: monoklonális antitest
MAdCAM-1: mukózális adresszin sejt adhéziós molekula 1
mat ILF: érett izolált nyiroktüsző
mLN: mezenterialis nyirokcsomó
MRC: marginális retikuláris sejt
MUC19: mucin 19
MyD88: mieloid differenciálódási 88. faktor adapterfehérje
NF- κ B: nukleáris faktor kappa-B
NOD2: nukleotid-kötő oligomerizációs domén-tartalmú fehérje 2 kódoló gén
pLN: perifériás nyirokcsomó
PNA: peanut (földimogyoró) agglutinin
PNAd perifériás nyirokcsomó adresszin
PP: Peyer plakk
Prox1: prospero homeobox fehérje 1
PTGER4: proszttaglandin E receptor 4
PTPN2: nem receptor tirozin foszfatáz fehérje 2
RA: retinolsav
RAG: rekombináció aktiváló gén
RET: receptor tirozin kináz
ROR γ t: retinoic acid related orphan receptor gamma-t
SCID: súlyos kombinált immundefektus
siILC3: 3-as típusú veleszületett (innate) limfoid sejt a vékonybélben
SILT: szoliter intesztinális nyirokszövetek

SNP: egy pontos nukleotid polimorfizmus
STAT3: signal transducer and activator of transcription 3
Th1: 1-es típusú T-helper sejt
Th17: 17-es típusú T-helper sejt
Th2: 2-es típusú T-helper sejt
TLR: Toll-like receptor
TNF α : tumor nekrozis faktor alfa
TRANCE: TNF-related activation-induced cytokine
UC: colitis ulcerosa
VAP-1: ér-asszociált fehérje 1
VCAM-1: vaszkuláris sejt adhéziós molekula-1
VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
XPB1: x-box kötő fehérje-1

1. Bevezetés

1.1 A gyulladásoos bélbetegségek

A gyulladásoos bélbetegséget (IBD) az egyik leggyakrabban előforduló gyulladásoos kórfolyamatként tartják számon. Számos személyt érint világszerte, leggyakrabban fiatal felnőttekben alakul ki, 15-30 éves kor között. (1) Két fő típusát különböztethetjük meg, ezek a Crohn betegség (CD) és a colitis ulcerosa (UC) vagy fekélyes vastagbélgyulladás.

Crohn betegségben a colon és az ileum is érintett lehet. A gyulladás transzmurális jellegű, mélyebb rétegeket érint, megjelenése egymástól elkülönülő szakaszokon, foltokban jelentkezhethet. A colitis ulcerosa esetében a rectum, a colon egyes szakaszai, vagy a teljes colon is érintett lehet. A gyulladás csak a nyálkahártya felső rétegét érinti egy összefüggő területen. A CD kialakulásában jelentősebb szerepet kapnak a genetikai összetevők, mint UC esetében, de mindkét betegség kialakulásához hozzájárulhatnak bizonyos genetikai és környezeti faktorok. (2, 3)

1.1.1 Genetikai és környezeti tényezők szerepe IBD kialakulásában

Gyakran előfordul, hogy egy családon belül az IBD mindkét típusa megjelenik. Ebből arra következtethetünk, hogy egyes gének mindkét betegség kialakulásában szerepet játszhatnak. (4) Az elmúlt években GWAS analízisek segítségével több, mint 200, IBD-vel összefüggésbe hozható lókuszt azonosítottak, melyek körülbelül 300 génasszociációt jelentenek (5, 6), ezen felül napjainkban a legújabb meta-analízis és fine-mapping módszerek segítségével további IBD asszociált lókuszt azonosítottak. (7) A több száz azonosított genetikai eltérés - többnyire egypontos nukleotid polimorfizmus (SNP) - ellenére, csak kevésről sikerült bizonyítani, hogy valós biológiai szerepük van az IBD kialakulásában. A következőkben néhány konkrét igazolt genetikai rizikófaktor kerül bemutatásra, melyek jól szemléltetik azon folyamatok sokrétűségét, melyek az IBD kialakulásához vezethetnek.

CD esetében a nukleotid-kötő oligomerizációs domén 2 gén (*NOD2 (CARD15)*) volt az egyik legkorábban azonosított kockázati faktor. Az általa kódolt NOD2 citoplazmatikus fehérje a bakteriális peptidoglikánok általános szenzorának tekinthető, amely az NF- κ B jelátviteli útvonalon keresztül IL-1, TNF α és antimikrobiális peptidok termelését aktiválja. Proinflammatorikus tulajdonsága mellett a bél immunrendszerének aktivációját is szabályozza, így a tolerancia fenntartásában is fontos szerepe van. A

NOD2 gént érintő SNP (1007fs mutáció) az NF- κ B overaktivációja, valamint az antimikrobiális rezisztencia csökkenése révén a veleszületett immunválasz zavarát okozza. (8)

Számos genetikai asszociációt fedeztek fel az IBD és az *IL23R* között is (9), továbbá CD-ben és UC-ben is leírták több, IL-23 mediálta Th17 aktivációs útvonalat érintő gén jelentőségét, melyeknek a gyulladós folyamatok szabályozásában van fontos szerepe. (10)

Az autofágia-függő fehérje 16-1 és az immunitás-függő GTPáz család M fehérje kódoló génjei (*ATG16L1*, *IRGM*) az autofágia indukálásában játszott szerepük miatt a baktériumok eltávolításában, valamint az epitél barrier funkció fenntartásában is fontosak lehetnek. Az *ATG16L1* és *IRGM* géneket érintő SNP-k az epitél barrier funkció sérülése révén hozzájárulhatnak a CD kialakulásához. (11)

A prosztaglandin E2 receptor 4 (EP4) szintén fontos szerepet játszik a mukózális barrier funkció fenntartásában. Az EP4 proinflammatorikus szerepét az a kísérlet igazolja, melynek során EP4 antagonistá kezelte egerekben nagyobb valószínűséggel alakult ki colitis, DSS kezelés hatására. Emberben az EP4-et kódoló *PTGER4* gén közelében leírt polimorfizmust UC kialakulásával hozták kapcsolatba. (12, 13)

A nyálka termelésért felelős fehérjecsald egy tagját kódoló mucin 19 (*MUC19*) gén egyes variánsai szintén a CD-ben játszhatnak szerepet, az epitél sejtek (kehelysejtek) mucin termelő képességének és a barrier funkció csökkenésének következtében.

A *JAK2* (janus kináz 2), *STAT3* (Signal transducer and activator of transcription 3) gének variánsait is kapcsolatba hozták IBD kialakulásával. A *JAK2* és *STAT3* fontos elemei az IL-23R jelátvitelnek, emellett a *STAT3* a Th17 differenciációban is kiemelt szerepet játszik. Az IL-23/Th17 útvonal résztvevőiként tehát a gyulladás indukálásáért felelősek. (14)

Az X-box kötő fehérje-1 az endoplazmatikus retikulum stressz válasz kulcseleme. Kódoló génjének (*XBP-1*) egér bél endotélből történő delécioja gyulladást indukál a vékonybélben. (15)

Colitis ulcerosában az egyik legfontosabb teljes genomasszociációs analízissel (GWAS) azonosított kockázati faktor a *HLA-DRB* gének között a *HLA-DRB1*, melynek bizonyos alléljei a CD-el is összefüggésbe hozhatók. (16)

A GWAS analízisben nyert adatok fine mapping vizsgálatával bizonyos integrin kódoló gének szerepét is kimutatták IBD-ben. Ezek az allélok az integrin expresszió fokozása révén növelték a betegség kialakulásának kockázatát. (17)

Emberben az Nkx2-3 homeodomén-típusú transzkripciós faktor kódoló régiójának SNP-jét CD és UC előfordulásával is társították, (18, 19) továbbá kimutatták a *PTPN2* (Nem receptor tirozin foszfatáz fehérje 2) CD kockázati gén expressziójára (20), valamint a bél mikrovaszkuláris sejtjeiben történő VEGF (vaszkuláris endotél növekedési faktor) jelátvitel és endotelin-1 termelésre gyakorolt szabályozó hatását is. (21)

Napjainkban a gyulladós bélbetegségek leggyakrabban a fejlett nyugati országokban fordulnak elő. Habár a GWAS analízisek során számos olyan genetikai összetevőt fedeztek fel, melyeknek szerepe lehet az IBD kialakulásában, ezek az IBD örökletes előfordulásának csak egy részére adnak magyarázatot. Mindezekből arra következtethetünk, hogy az IBD kialakulásában jelentős szerepe van a környezeti faktoroknak is. Ezek közé sorolhatók a megváltozott étkezési szokások, ezen belül a feldolgozott élelmiszerek nagymértékű fogyasztása, adalékok jelenléte, valamint az antibiotikum használat és a dohányzás is. Ezen tényezők összessége a mikrobiom összetételének változását, az epitél barrier funkciójának csökkenését okozhatja, az immunrendszer kóros aktivációjának köszönhetően pedig gyulladást indukálhat. (1)

1.1.2 A mikrobiom és a barrier szerepe

A bél mikrobiomja születéstől fogva folyamatos átalakuláson megy keresztül a fejlődési folyamatok és környezeti tényezők hatására, melynek eredményeként egyénre jellemző összetételűvé válik. (22) Ez a mikrobiom fontos szerepet játszik a szervezet megfelelő tápanyagfelvételének biztosításában, valamint az emésztőcsatorna immunrendszerének kialakításában és szabályozásában. (23) A gazdaszervezet és a mikrobiomot alkotó baktériumok közötti kapcsolat mindkét fél számára előnyökkel járhat, azonban ahhoz, hogy a köztük lévő kényes egyensúly fennmaradjon, az immunrendszer finom szabályozása szükséges. Ha ez az egyensúly felborul, az súlyos gyulladós folyamatok kialakulásához vezethet. A mikrobiom bélgyulladásban játszott szerepét bizonyítja, hogy a legtöbb colitis egérmódel létrehozásához szükség van a mikrobiomot alkotó baktériumok bélben való megtelepedésére. (24)

A mikrobiom mellett a bélben természetesen nem előforduló patogén baktériumok, mint egyes *Escherichia coli* (*E. coli*) fajok is hozzájárulhatnak a kóros gyulladós folyamatok előidézéséhez a béltraktusban. Az adherens-invazív *E. coli* például képes a karcinoembrionális antigén-függő sejt adhéziós molekula 6-on (CEACAM6) keresztül -melyet a CD-ben szenvedők epitél sejtjei kórosan

expresszálnak- megtapadni az ileumban. (25) Ezek az epitél sejtek alkotják azt a barrier felületet, amely a béllument az alsóbb szöveti rétegekben található limfoid szövetektől elhatárolja, valamint biztosítják, hogy az emésztőcsatornában található bakteriális és más antigének csak korlátozott számban legyenek hozzáférhetők a mukózális immunrendszer számára. IBD-ben ez a barrier funkció a bélfal permeabilizációjának növekedése következtében sérül, ennek következményeképpen pedig gyulladás alakulhat ki. (26) A gyulladásos folyamat során a Paneth és kehelysejtek is sérülhetnek, nyálka és defenzin termelő funkciójuk lecsökkenhet. Ezáltal a mikrobák könnyebb hozzáférést nyernek az epitél réteghez, amely tovább súlyosbíthatja a gyulladásos kórképet.(27)

1.1.3 Immunválasz eltolódás

A bél homeosztatiszikus egyensúlyának fenntartásához elengedhetetlen az immunválasz proinflammatorikus jelátviteli útvonalain keresztüli szabályozása. A mikrobióta elleni immunválasz szuppressziója, valamint a patogének elleni támadó jellegű immunválasz közötti egyensúly felborulása IBD kialakulásához vezethet. (2) Az immunválaszok helyszínéként működő lamina propria (LP) Peyer-plakkok (PP), mezenterialis nyirokcsomók (mLN) és izolált nyiroktüszők (ILF) együttese alkotja a bél asszociált nyirokszöveteket (GALT), melyek számos immunsejtnek adnak otthont. Ezek a 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 gyulladásos folyamatokat indukálhatnak. A mukózában való felszaporodásuk és túlzott aktivációjuk az IFN γ , TNF α , IL-1 β , és az IL-23 indukált IL-17 gyulladásos faktorok nagymértékű termelését vonja maga után. Ebben a folyamatban fontos szerepe van a különböző CD4⁺ T-helper alcsoportoknak (Th1, Th2, Th17), valamint a FoxP3⁺ regulatorikus T-sejtek IL-10 és TGF β termelésén keresztüli gyulladásgátló hatásának is. (28) Ezen sejtek fejlődésében és funkciójuk szabályozásában történő eltérések tehát szintén gyulladás kialakulásához vezethetnek. (29, 30)

A mukózális védelemben a T-sejtek mellett IgA termelésük révén a B-sejtek is részt vesznek. Korábbi kutatások alapján a bél-asszociált nyirokszövetekben található B-sejtek proinflammatorikus és gyulladásgátló hatást is kifejthetnek. Colitis egérmodellben megfigyelték az mLN-ből származó CD1⁺ regulatorikus B sejtek IL-10 általi gyulladásgátló hatását IL-1 és STAT3 mediálta gyulladás során. (31)

A mikrobiom iránti tolerancia fenntartásában további fontos szerepet játszik az M-sejteken keresztüli, illetve dendritikus sejtek általi folyamatos mikrobióta eredetű antigén folyamatos közvetítése, valamint az antigén bemutatása révén kialakuló immunológiai memória. (32)

Az immunsejtek szabályozott bélbe vándorlása az ér-endotél hálózaton keresztül valósul meg. Ennek során a retinolsav (RA) mediálta $\alpha 4\beta 7$ integrin expresszió révén a fehérvérsejtek a mukózális adresszin sejt adhéziós molekula-1-et (MAdCAM-1) expresszáló endotél sejtekhez vándorolnak. Az ér endotél sejtek adhéziós molekula expresszióját számos faktor befolyásolja. Krónikus gyulladás során a megnövekedett IL-1 és TNF α szint emelkedett adhéziós molekula expressziót eredményezhet, melynek következtében a limfoid sejtek nagy számban fognak a bélbe vándorolni, emellett a limfociták magas arányú bél homingját a gyulladással emelkedett szintje is előidézhetheti. (33)

Az Nkx2-3 transzkripciós faktor szabályozza a MAdCAM-1 mukózális adresszin kifejeződését, amely a leukociták felszínén kifejeződő $\alpha 4\beta 7$ bél homing receptoron keresztül lehetővé teszi a limfoid sejtek bélbe történő vándorlását. (34) Ezen endotél faktorok hiányában a bélbe történő limfocita homingban zavar keletkezik, amely hatással van a helyi immunválasz és a gyulladással lefolyására. (35) Tehát az Nkx2-3 a bél-nyálkahártya ereinek adresszin-mintázatának befolyásolásán keresztül kapcsolatba hozható az IBD kialakulásával.

1.1.4 Állatmodellek

Az IBD-vel kapcsolatos vizsgálatokhoz olyan állatmodellekre van szükségünk, melyek megbízhatóan reprezentálják az IBD következtében kialakuló kóros elváltozásokat és az ezzel együtt járó immunológiai reakciókat.

Az IBDs állatmodelleket a létrehozásuk módja alapján az alábbi négy csoportba sorolhatjuk:

- kémiai modellek
- genetikailag módosított modellek
- sejt transzfer modellek
- kongenikus modellek.

A kémiai modellek létrehozásához olyan irritáns ágenseket alkalmaznak, melyek akut sérüléseket generálnak a bélben. Erre a célra leggyakrabban dextranszódium szulfátot (DSS) használnak, amely a bélfal irritációján keresztül képes gyulladást indukálni.

Genetikailag módosított modelleket különböző, az IBD patogenezissel összefüggésbe hozható fehérjéket kódoló gének célzott deléciójával vagy overexpressziójával hoznak létre. Ezek a modellek, melyeket gyakran kémiai ágensekkel kombinálva alkalmaznak, ideálisak lehetnek a különböző genetikai tényezők egymástól független vizsgálatára.

A sejttanszfer modellekben különböző fokú immunhiányban szenvedő gazdaszervezeteket oltanak be T-sejtekkel. Ilyenek például a SCID vagy RAG recipiens egértörzsek, a tipikus eljárás pedig a CD45RB^{hi} T-sejtek átvitele.

A kongenikus törzsekben az állatok speciális genetikai háttérének és tenyésztésnek köszönhetően spontán kialakulhat IBD. A négy említett modell közül a kongenikus modellek reprezentálják leginkább a humán IBD-ben megfigyelhető állapotot, viszont ezek előállítása és fenntartása a legbonyolultabb.

Habár a legtöbb IBD egérmódel csak colitis indukálására alkalmas, van néhány ileitis módel is. (36, 37) Ezek közé tartoznak a génmódosított Tnf^{ΔARE/+}, valamint a SAMP1/YitFc kongenikus egérmódellek. (38,39)

1.2 A bél-asszociált nyirokszövetek fejlődésbiológiai jellemzői

A bél asszociált nyirokszövetek (GALT) fontos szerepet játszanak a bél helyi immunológiai homeosztázisának fenntartásában, gyulladáshos, valamint szisztémás immunológiai folyamatok szabályozásában. Fejlődésük és struktúrájuk kialakítása és fenntartása számos összetevő együttes szabályozásán keresztül valósul meg. Ezek a másodlagos nyirokszervek találkozóponként szolgálnak az immunrendszer sejtei és az antigének számára, így nélkülözhetetlenek a megfelelő immunválasz indukálásához.

A GALT-ot diffúz és organizált összetevőkre oszthatjuk fel. Az organizált GALT-hoz a mezenterális nyirokcsomók, Peyer plakkok (PP) colon plakkok (ColP) és SILT-ek (szoliter intesztinális nyirokszövetek) tartoznak, a diffúz GALT-ot pedig a lamina propria limfociták (LPL), az intraepiteliális limfociták (IEL) és más itt elhelyezkedő immunkompetens sejtek összessége alkotja.

A mezenterális nyirokcsomók PP-ok és ColP-ok programozott kialakulása már embrionális korban megkezdődik, ezzel szemben a SILT-képződés csak posztnatálisan, indukált módon megy végbe. Kialakulásukhoz nélkülözhetetlen a mezenchimális

strómasejtek és a hematopoetikus limfoid szövet indukáló (LTi) sejtek közti kölcsönhatás emberben és egérben is. A GALT fejlődésének részleteiről emberben csak keveset tudunk, mivel vizsgálata etikai és technikai nehézségekbe ütközik, ezért jelenlegi tudásunk nagyrészt az állatkísérletes -főként egereken végzett- kutatások során megfigyeltekre szorítkozik.

1.2.1 Mezentériális nyirokcsomó

A nyirokcsomó előtelep -hasonlóan más másodlagos nyirokszervekhez- a hematopoetikus eredetű limfoid szövet indukáló (LTi) sejtek valamint a VCAM-1⁺ ICAM-1⁺ MAdCAM-1⁺ limfoid szövet szervező (LTo) mezenchimális stróma sejtek interakciója során jön létre. (40) A CD3⁻CD4⁺IL-7Rα⁺α4β7⁺ fenotípusú LTi sejtek az innate limfoid sejtek hármass alcsoportjába (ILC3) tartoznak. Ezen sejtek kialakulásához elengedhetetlenek az DNS-kötő fehérje inhibitor 2 (Id2) és RORγt transzkripciós faktorok, melyek hiányában nem csak a nyirokcsomók, de a PP-ok fejlődése is gátolt. (41,42) Az Id2 és RORγt mellett a limfatikus endotél által expresszált prospero homeobox fehérje 1 (Prox1) transzkripciós faktor is kiemelkedő fontosságú a formálódó nyirokcsomók fejlődésében a LYVE1⁺ (nyirokér endotél hialuronan receptor 1) nyirokér hálózat kialakításában játszott szerepe miatt.(43)

Az LTi sejtek LTαβ2-t expresszálnak, amely az LTo sejtek LTβR ligandjaként funkcionál. A LTαβ-kifejeződéséhez nagyban hozzájárul az IL-7, amely az IL-7Rα⁺ LTi sejtek kialakulásához és fenntartásához is nélkülözhetetlen. Érdekes módon a mezentériális nyirokcsomókat kialakító LTo sejtekben magasabb RANKL, IL-6, CXCL1, CCL7 és CCL11 expressziós szintet írtak le, ezzel szemben a PP-okat kialakító LTo sejtekben a CCL21 CCL19 és CXCL13, kemokinek expressziós szintje magasabb. (44) Ezek a génexpressziós különbségek is jól mutatják, hogy a másodlagos nyirokszervek kialakulásában a különböző faktorok eltérő szereppel bírnak.

Természetesen nem csak a szolúbilis faktorok, hanem az általuk kiváltott szignalizációs események is meghatározóak ezekben a fejlődési folyamatokban. A LT jelátvitel az NF-κB útvonal aktiválásával az egyik legfontosabb pontja a nyirokcsomók és PP-ok fejlődésének. Ezt az is bizonyítja, hogy *Ltbr*^{-/-} egerekben a másodlagos nyirokszervek kialakulása súlyos defektust szenved, nem alakulnak ki Peyer-plakkok és nyirokcsomók, míg a lép fehér pulpa szerkezete nem tartalmaz marginális zónát, valamint folliculáris dendritikus sejteket. (45) Az NF-κB útvonal aktiválása indukálja az LTo sejtek által expresszált adhézions molekulák kifejeződését (VCAM-1, ICAM-1,

MAdCAM-1), valamint számos citokin és homeosztatis kemokin expresszióját is elősegíti (IL-7, CCL19, CXCL13, CCL21). Ezek a faktorok kezdetben az LT_i sejtek, majd később az érett T és B limfociták odavonzásában, ezzel párhuzamosan pedig az adott nyirokszerv folliculáris szerkezetének (T/B-sejt zónák) kialakításában és fenntartásában elengedhetetlenek. (46)

A nyirokcsomók folliculáris szerkezete egérben csak a születés utáni időszakban kezd kialakulni. Ez a folyamat a magas endotelű venulák (HEV) adresszin mintázatának fokozatos átalakulása révén mehet végbe, melynek során a MAdCAM-1 expressziója lecsökken, a PNA_d expresszió pedig CD34 és GlyCAM-1 által szabályozott folyamat révén emelkedik. (47)

1.2.2 Peyer plakk

A nyirokcsomókkal ellentétben, a bél antimezenterialis oldalán elhelyezkedő PP-okat nem borítja külső tok, afferens limfatikus erek sincsenek, viszont rendelkeznek a nyirokcsomókra is jellemző HEV-ekkel, melyek a PP-ok esetében MAdCAM-1-et expresszálnak, amely az LT_i sejtek $\alpha 4\beta 7$ integrinjéhez képes kötődni. Mezenterialis nyirokcsomókban a MAdCAM-1 és PNA_d lumenálisan expresszálódik, PP-ok esetében viszont a PNA_d csak a HEV endotél sejtek bazolaterális felszínén jelenik meg, ezért nem vesz részt a limfocita homingban.

A PP-ok fejlődése a mLN-hoz hasonlóan programozottan megy végbe egérben és emberben is. Fejlődésük egérben részletesen ismert, viszont emberben való kialakulásuk pontos folyamatáról csak keveset tudunk. Egérben az embrionális máj eredetű hematopoetikus sejtek először a 12,5 napon kezdenek el megjelenni a bélben. Ezek a sejtek kezdetben diffúzan helyezkednek el, majd a 15,5 napra csoportokba rendeződnek ott, ahol később a PP-ok fejlődése megy majd végbe. Ezekben a klaszterekben a LT $\alpha\beta$ és $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 4\beta 1$ expresszáló LT_i és a VCAM-1, ICAM-1 és MAdCAM-1 expresszáló L_T_o sejtek együttese alkotja majd a PP előtelepet. (48, 49) A PP-ok kialakulásához az LT_i és L_T_o sejtek mellett a CD3⁻CD4⁻c-kit⁺IL-7R α ⁻CD11c⁺ limfoid szövet iniciátor (LT_{in}) sejtek is szükségesek. Veiga és munkatársai szerint a CD45⁺CD4⁻CD3⁻IL7R α ⁻Kit⁺CD11c⁺ hematopoetikus sejtpopuláció egy alcsoportja a limfotoxin mellett tirozin receptor kinázt (RET) is expresszál, amely az enterális idegrendszer kialakulásához is elengedhetetlen. A RET jelátvitel tehát a bél neurális és limfoid hálózatának kialakításában is kulcsszerepet játszik. (49)

PP-ok esetében a CXCL13 kemokin fogja elősegíteni a CXCR5-öt hordozó LT_i sejtek PP előtelepbe vándorlását, valamint $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1, illetve $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-1 interakción keresztüli adhézióját. (50) Később az LT_i sejtek által expresszált LT $\alpha\beta$ -nak köszönhetően olyan NF κ B függő jelátviteli folyamatok aktiválódnak a LT β R-on keresztül, melyek elengedhetetlenek az LTo sejtek differenciációjához, valamint adhéziós molekula és homeosztatis kemokin expressziójuk upregulációjához. Ennek következtében további LT_i, majd T-, B-sejtek telepednek meg a PP előtelepben, amely a PP-ok végleges folliculáris szerkezetének kialakulásához nélkülözhetetlen. (51)

1.2.3 Colon plakk

A colon plakkok (ColP) a vékonybél PP-jaival megegyező, a colon, rectum és a caecum submucosájában elhelyezkedő másodlagos nyirokszervek, melyek egérben és emberben is megtalálhatóak. Szerkezetük és kialakulásuk a PP-éval szinte teljesen azonos. Fejlődésük programozottan megy végbe LT β -R, IL7-R függő folyamatok során. A ColP-ok kialakulásához szükség van a CXCL13-ra, viszont a PP-okkal ellentétben fejlődésük CCR6, CCL20 és CXCL10 független, ugyanakkor esetükben a DC-ek kolonizációja CCR7 függő folyamat. A ColP-ok a CD35⁺ FDC-ek mellett folliculusokba rendeződött B-sejteket, T-sejtes zónát, MAdCAM-1⁺ HEV-eket és gp38⁺VCAM-1⁺ strómasejteket tartalmaznak. (52)

1.2.4 Indukált GALT fejlődés: Szoliter intesztinális nyirokszövetek (SILT)

Az előzőekben ismertetett bél-asszociált, programozott fejlődésű nyirokszervekkel ellentétben a SILT-ek kialakulása posztnatálisan, a bél mikrobiális kolonizációja által indukált módon megy végbe. A vékony és vastagbél lamina propriában elhelyezkedő SILT-ek közvetlen kapcsolatban állnak a bél epitél rétegével. A SILT-ek csoportját a kezdetleges szerveződésű, főleg lin⁻ LT_i sejteket tartalmazó kriptoplakkok (CP), valamint az ezekből kialakuló, B-sejt folliculussal rendelkező izolált nyiroktüszők (ILF) alkotják, melyek nem tartalmaznak HEV-eket és elkülönült T-sejt zónát. A SILT struktúrák megoszlásáról emberben csak kevés adat áll rendelkezésre. Korábban úgy vélték emberben csak ILF-ek alakulhatnak ki, később Lügering és munkatársai CP-szerű struktúrák meglétét is kimutatták a bélben. (53)

A CP-okban található ROR γ ⁺ LT_i-szerű sejtek mikrobiális stimulust követően képesek indukálni a CP-ILF átalakulást. Az ILC3 típusú LT_i sejtek kialakulásához a már említett Id2 és ROR γ t mellett az aryl hydrocarbon (AHR) transzkripció faktor is

elengedhetetlen, ezzel szemben az Ikaros az AHR gátlásán keresztül megakadályozza az LT_i sejtek kialakulását. (54, 55) Az IL-22 expresszázó ILC3 sejtek a CP/ILF fejlődést a limfotoxin útvonalon keresztül képesek indukálni. AHR hiányában tehát csak elszórtan alakulnak ki SILT-ek. (56) A vékonybélben található SILT-ek kialakulása CXCL13-CXCR5 függő, ezzel ellentétben a colonban található CP-ok CXCL13, CCR6 független módon is kialakulhatnak. (52, 57)

Az ILF további érésében szintén fontos szerepet kap a bél mikroflórája. A B-sejtes kolonizációhoz elengedhetetlen a CCL20 -az LT_i sejteken is megtalálható CCR6 ligandja- melynek expresszióját a Gram-negatív kommenzalista baktériumok NOD-1-en keresztüli felismerése indukálja. Ezt követően, a follikuláris szerkezet kialakulása TLR2/4, MyD88 függő folyamat során megy végbe. (58, 59) Egérben a második posztnatális hétre a SILT-ek minden formája megtalálható lesz a bélben, a kezdetleges szerkezetű CP-októl az éretlen ILF-eken át az érett ILF-ekig, melyek egyetlen CD35⁺ DC-ekkel rendelkező B-sejtes follikulust, valamint azt szegélyező, de elkülönülő T-sejt zónába nem rendeződő T és LT_i sejteket tartalmaznak.

1.3 Az ILC sejtek jelentősége és alcsoportjaik jellemzői

Az innate limfoid sejtek (ILC) hematopoetikus őssejtből történő kialakulásához számos transzkripciós faktor közreműködése szükséges, ezek közül az egyik legfontosabb az Id2. Az Id2 számos más faktoral együtt elengedhetetlen ahhoz, hogy a közös limfoid progenitorból a különböző ILC alcsoportok létrejöhessenek. (60) Az ILC sejtek közös tulajdonsága, hogy bár morfológiájuk a limfoid sejtekével azonos és szelektív kifejeződésű transzkripciós faktorok hatására T-helper típusú citokinek termelésére is képesek, nem rendelkeznek géntrendeződés során létrejövő antigén specifikus receptorokkal. 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. (61)

Az ILC-k számos funkciót látnak el különböző immunológiai folyamatokban, a nyirokszövetek fejlődésétől a mukózális felszín homeosztázisának fenntartásán át, a kórokozók elleni védelem, és a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok szabályozásáig. (61) Transzkripciós faktor profiljuk és citokin termelő képességük alapján három fő, funkciójukban is eltérő csoportba sorolhatjuk őket. Fontos megjegyezni, hogy az egyes

alcsoporthoz fenotípusa és funkciója igen hasonló emberben és egérben, viszont gyakran eltérő markerekkel jellemezhetőek, valamint igen plasztikusak is, hiszen az őket alkotó sejtek megváltozott mikrokörnyezetben, például eltérő citokinek hatására, típust válthatnak.

Az **ILC1** csoportba tartoznak a természetes ölósejtek (NK) valamint más ILC1 sejtek, melyek számos szövetben megtalálhatóak. Kialakulásához elengedhetetlen a T-bet transzkripciós faktor. Ezek a sejtek IL-15, IL-18 és IL-12 függő módon IFN γ -t termelésre képesek, és a vírusfertőzött és tumoros sejtek eltávolításában játszanak szerepet. (62)

Az **ILC2** csoport sejtjei heterogén populációt alkotnak, melyek jellemzően a légutak és a bél mukózális szöveteiben fordulnak elő. Jellegzetes transzkripciós faktoruk a GATA-kötő fehérje-3 (GATA-3). Ezek a sejtek IL-25 és IL-33 által szabályozott módon Th2-típusú citokineket termelnek (IL-5, IL-13), szerepük a Th-2 típusú immunválaszban és a paraziták elleni védelemben jelentős. (63)

Az **ILC3** csoport szintén változatos sejt típusokat foglal magában, melyek közös jellemzője a ROR γ t transzkripciós faktor, valamint az AHR expresszió, melyek az ILC3 sejt típus kialakulásához és fenntartásához elengedhetetlenek. Az ILC3 sejtek legnagyobb számban a bél lamina propria rétegében vannak jelen. Ezen sejtek különböző alcsoporthoz részt vesznek a limfoid organogenezisben, gyulladásozó folyamatok szabályozásában, valamint bakteriális fertőzések elleni immunválaszban, emellett regeneratív feladatot is betöltenek (**1. ábra**).

A legkorábban felfedezett ILC3 alcsoporthoz a limfoid organogenezisben résztvevő LT_i sejtek alkotják. Az LT_i és LT_o sejtek közötti LT-függő interakció elengedhetetlen a másodlagos nyirokszervek kialakulásához, embrionális (pLN, mLN, PP) és posztnatális (ILF) korban is. Ezek a folyamatok részletesen bemutatásra kerültek az 1.2 fejezetben. (64)

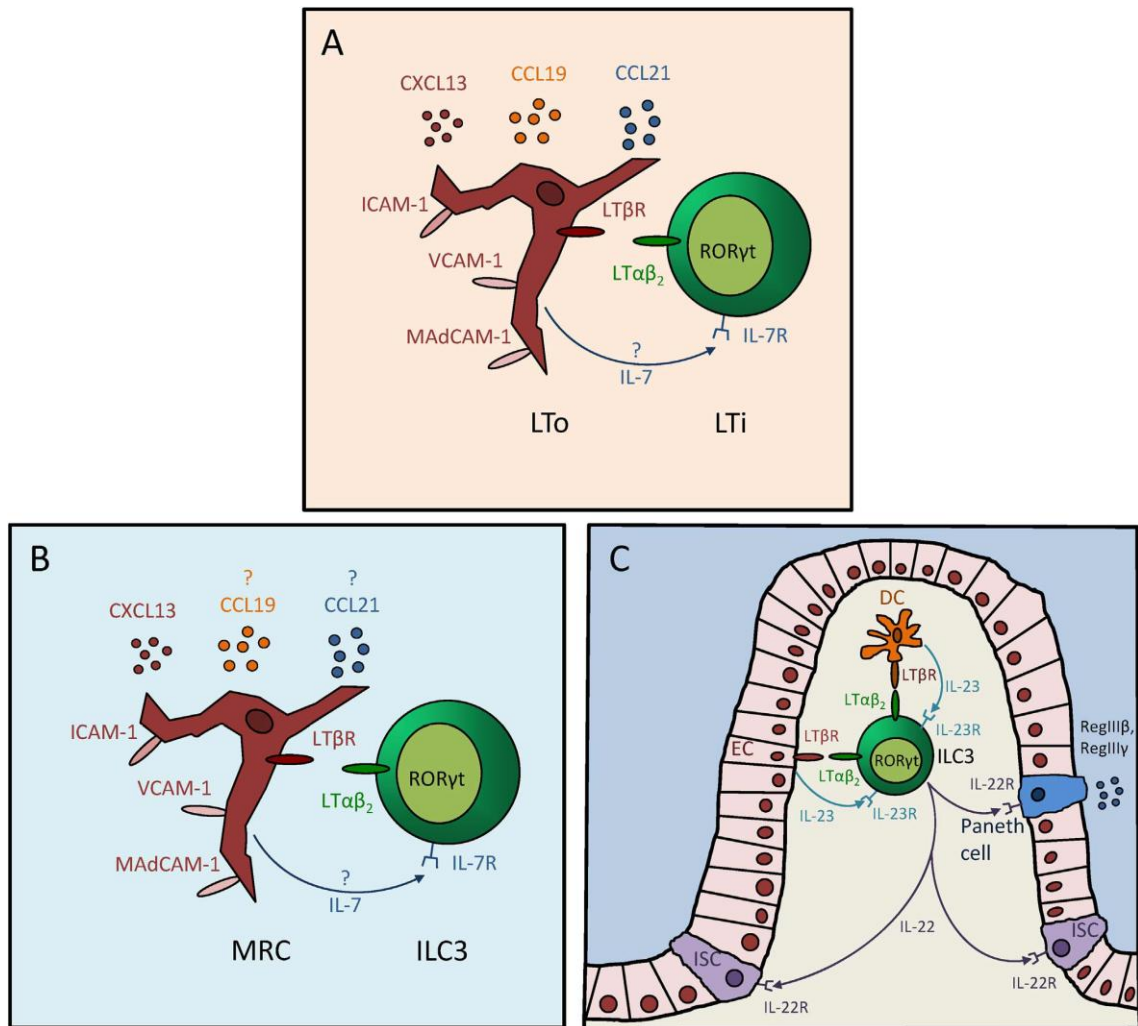
A CCR6⁺NKp46⁻ LT_i sejtek mellett CCR6⁻NKp46⁺, valamint CCR6⁻NKp46⁻ ILC3 alcsoporthoz különböztetünk meg. Az ILC3 sejtek IL-23 indukció hatására IL-22 és IL-17 termelésére képesek. (65)

A CCR6⁻NKp46⁺ ILC3 sejtek a bakteriális patogénekkal szembeni védelemben játszanak szerepet. Legnagyobb számban a bélben fordulnak elő, ahol IL-22 termelő képességük révén szabályozzák az olyan kórokozó baktériumok, mint a *Citrobacter rodentium* elleni immunválaszt. (66) A patogénekkal szembeni immunválasz mellett az epitel és immunsejtekkel valamint a bél mikroflórájával való folyamatos kölcsönhatásuk

révén képesek a bélhám homeosztázisának szabályozására is. Az IL-22 termelő ILC3 sejtek képesek indukálni az epitél sejtek RegIII β és RegIII γ antimikrobiális peptidek kifejeződését, valamint defenzin termelését. (67)

A kettős negatív CCR6⁻NKp46⁻ ILC3 sejtek főleg gyulladás során szaporodnak fel a bélben. Ezek az IL-17 és IFN γ termelő sejtek a CP-okból mobilizálódva képesek gyulladást indukálni. (68)

Az ILC3 sejtek kettős szerepet töltenek be a gyulladásos folyamatokban, mivel IL-22 és IL-17 termelő képességük révén anti-inflammatorikus és pro-inflammatorikus tulajdonsággal egyaránt rendelkeznek. (63) Az ILC3 sejtek aktivációjának és citokin termelésének egyensúlyi szabályozása igen összetett folyamat, melynek zavara hozzájárulhat az IBD kialakulásához.



1. ábra. ILC–stróma kölcsönhatások összetevői és szerepük a limfoid organogenezisben és az immunológiai védelemben.

A, magzati nyirokcsomó előtelep; B, felnőttkori nyirokcsomó; C, felnőttkori lamina propria. Rövidítések: LTo, limfoid szövet szervező sejt; LTi, limfoid szövet indukáló sejt; MRC, marginális retikuláris sejt; ILC3, 3-as típusú innate limfoid sejt; ISC, intesztinális őssejt; EC, epitélisejt; DC, dendritikus sejt. (63)

1.4 Az Nkx2-3 transzkripciós faktor

Az összetett szervezetek kialakulásához a génexpresszió nagyfokú koordinációja szükséges. Ezt a szerepet töltik be a helix-turn-helix DNS kötő motívumokkal rendelkező homeobox gének, melyeket először *Drosophila* egyedekben írtak le. Ezek a homeobox gének kiemelt szabályozó szerepet játszanak számos fejlődési folyamatban, többek között a mezoderma kialakulásában.

A homeobox gének legnagyobb családját a HOX osztályba tartozó transzkripciós faktorok alkotják, melyek valószínűsíthetően filogenetikai rokonságban állnak a homeobox kódoló gének második legnagyobb csoportjával, az NK osztályú homeobox génekkel. *Drosophilákban* az NK gének két fő csoportját különböztethetjük

meg, az NK-1 osztályt, amely az NK-1 családot, és az NK-2-t, amely a szoros rokonságban álló NK-2, NK-3 és NK-4 családokat foglalja magában. Az NK-2 osztályba tartoznak a *tinman* és *bagpipe* gének, melyek a mezodermális differenciációért, a dorzális szívcső, valamint a bél izomzatának kialakulásáért felelősek. (69) Ezen gének megfelelőit a konzervált tirozin oldalláncok alapján gerincesekben is azonosították. (70, 71)

Az NK-2 osztályba tartozó gének mindegyike egy adott szerv vagy szövet kialakulásáért felelős. Ezen gének olyan jelátviteli útvonalak aktiválására képesek, melyek hozzájárulnak a szervezet kialakulásához, fenntartásához, normál működéséhez a sejtdifferenciáció, migráció valamint érési mechanizmusok szabályozásán keresztül. (72) Az NK-2 gének kódolják az Nkx transzkripciós faktorokat, melyek expressziós mintázatában igen gyakoriak az átfedések. Ezek a transzkripciós faktorok egy igen összetett és jól kiegyensúlyozott szabályozó rendszert alkotnak, amelyben a legkisebb változás is súlyos következményeket vonhat maga után. Az Nkx faktorok részt vesznek az ideg és érrendszer, a légutak és számos más szerv és szövet kialakulásának és működésének szabályozásában. (73)

Ezen faktorok egyike az Nkx2-3, amely más Nkx faktorokkal együttesen számos limfoid szövet és szerv kialakulásához valamint normál működésük fenntartásához nagyban hozzájárul. Más Nkx faktorokkal ellentétben (mint például az Nkx3-2 (Bapx1) vagy az Nkx2-5), melyek hiánya aszpléniát okoz, (74) Nkx2-3 hiányában a lép kialakulása nem gátolt, szerkezete viszont számos eltérést mutat. (75) Az Nkx2-3 faktor -az előbb említett faktorokkal ellentétben- nem csupán a lép, hanem más nyirokszervek fejlődésében is részt vesz. Az Nkx2-3 a lép mellett kifejeződik a bél egyes szakaszaiban, valamint a garati endodermában is. (76) Ez a faktor számos sejttípus kialakulásáért felelős, mint például az erek és a béltraktus simaizom sejtjei, a leukociták migrációjában résztvevő endotél sejtek, valamint a másodlagos nyirokszervek strómasejtjei. (77) Az Nkx2-3 elengedhetetlen az endotél sejteken való MAdCAM-1 kifejeződéséhez is. Ez az adresszin nélkülözhetetlen a mukózális szövetekbe történő limfocita hominghoz, mely az $\alpha 4\beta 7$ valamint L-selectin leukocita receptorok megkötésén keresztül valósul meg. (47)

Az Nkx2-3 faktor hiánya atrófiás rendezetlen szerkezetű lép, 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. (75)

Nkx2-3 hiányában a lép vörös pulpájában jelentős szerkezeti eltérések figyelhetők meg. A vörös pulpán belül valószínűleg a sinus endotél sejtek érintettek leginkább, mivel egérben ezen (az IBL-9/2 patkány antitesttel kimutatható) sejtek Nkx2-3 hiány esetén teljesen hiányoznak. (78) A vörös pulpa sinus endotél sejtek mellett a marginális zóna makrofágok, valamint a MAdCAM-1 pozitív marginális sinust szegélyező endotél sejtek összetételében is eltérés mutatkozik Nkx2-3 hiányában. Ezek az eltérések hasonlóak a limfotoxin béta receptor (LT β R) deficienciában tapasztaltakhoz, viszont a vörös pulpa vaszkuláris felépítésének zavara csak Nkx2-3 hiányában figyelhető meg. (79)

Míndezek mellett Nkx2-3 hiány esetén a lép erei kóros átalakuláson mennek keresztül. Ennek a LT β R függő folyamatnak az eredményeként PNAd pozitív nyirokcsomó-szerű HEV-ek alakulnak ki, melyek normál esetben a lépből teljesen hiányoznak. (80) Érdekes módon a LT β R jelátvitel konstitutív aktivációját követően is PNAd és MAdCAM-1 pozitív HEV-ek alakulnak ki a lépben (81), ezzel szemben Nkx2-3 hiányában az ektopiás HEV-ek endothel sejtjei csak PNAd-t expresszálnak felnőtt egerekben. (80)

Az Nkx2-3 transzkripciós faktor valószínűleg már igen korai stádiumban hatással van a lép vaszkuláris elköteleződésére, mivel hiányában, a limfatikus endotélre jellemző LYVE-1 pozitív endotél sejtekkel körülvett zsákszerű képződmények alakulnak ki a lépben. (82) Míndezek alapján elmondható, hogy Nkx2-3 hiányában leginkább a vörös pulpa szerkezete károsodik, de a fehér pulpában és a marginális zónában is jelentős eltérések mutatkoznak.

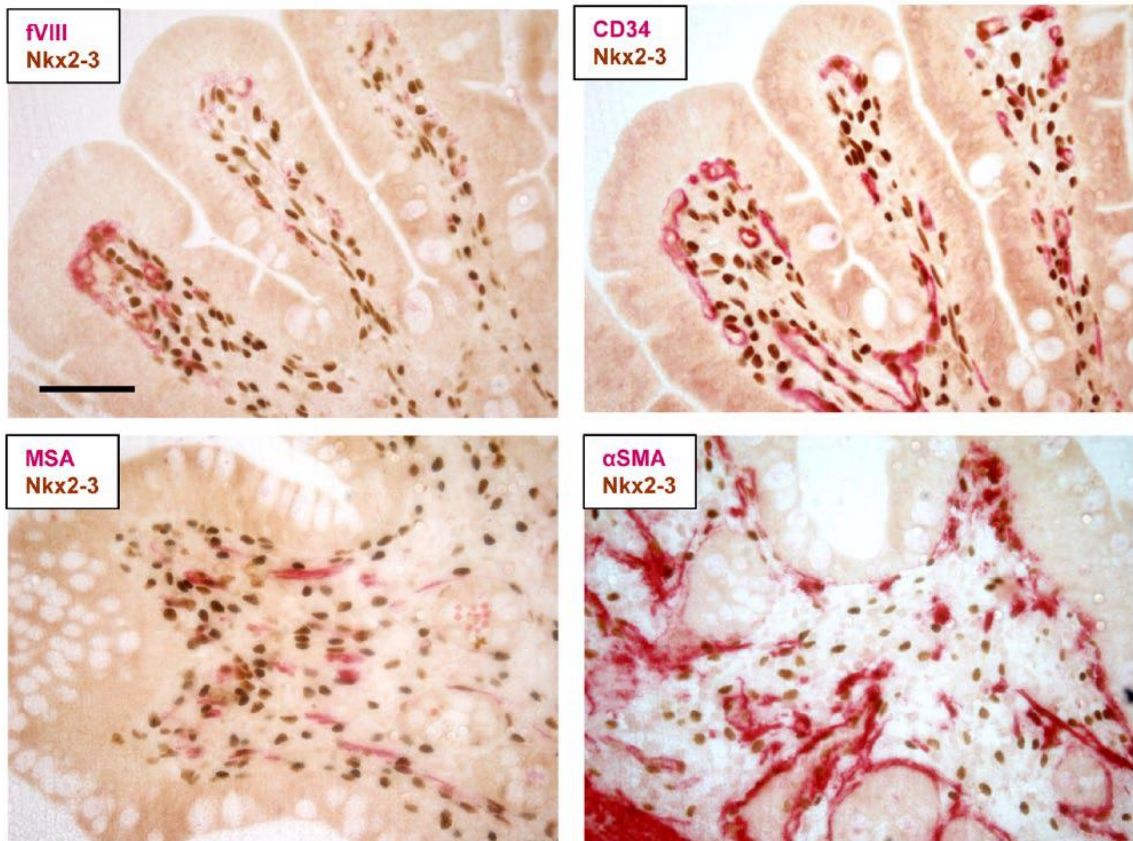
A lép mellett a PP-ok fejlődése is részlegesen gátolt Nkx2-3 hiányában, mivel Nkx2-3-hiányos egérben kevesebb és kisebb méretű PP-ok találhatóak vad típusú társaikhoz viszonyítva. (35) A PP-ok nem csak megoszlásukban és méretükben, de szerkezetükben is eltérést mutatnak Nkx2-3^{-/-} egerekben, mivel a mukózális HEV-ekben az Nkx2-3 függő MAdCAM-1-et a PNAd adresszin helyettesíti. Ezzel szemben a lamina propriában Nkx2-3 hiányában sem MAdCAM-1 sem PNAd nem expresszálódik a második posztnatális héttől. (83) Az Nkx2-3 transzkripciós faktor expressziója az emésztőrendszer egyes szakaszaira, valamint a bél asszociált nyirokszövetekre korlátozódik, ezért a PP-ok magas endotél és kapilláris endotél sejtjeiben is kifejeződik, a perifériás nyirokcsomókban viszont nincs kimutatható Nkx2-3 expresszió. (84)

Egérben a pLN HEV-eken expresszálódó MAdCAM-1 a születés utáni első hónap során fokozatosan eltűnik, helyét PNAd veszi át. (47) Ez az expressziós

mintázatbeli eltérés lehet az oka annak, hogy Nkx2-3 faktor hiányában (a léppel és PP-al ellentétben) a pLN-ek szerkezete nem mutat eltérést. (35) Az Nkx2-3 faktor tehát szövetspecifikus 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. Egy nemrégiben kifejlesztett anti-humán Nkx2-3 monoklonális antitesttel végzett immunhisztokémiai jelöléssel munkacsoportunk eredményei alapján az emberi lépben a vörös pulpa vénás szinuszeit bélelő CD31⁺CD34⁻vWF⁺ endotél sejtek expresszálják, ami alátámasztja az Nkx2-3 endotél-sejtek regionális specifikációjában játszott szerepét. (85) Megváltozott expressziója következtében felborulhat a mikrovaszkuláris endotél sejtek által szabályozott leukocita migráció és a gyulladással immunválasz folyamata is. (73) Bélben az Nkx2-3 faktor valószínűleg számos mezenchimális sejtben expresszálódik a colon szubepiteliális kötőszöveti rétegében. **(2. ábra)** Ezzel összefüggésben az Nkx2-3 faktor megváltozott expresszióját kapcsolatba hozták az IBD mindkét formájának kialakulásával. (18-21) A humán Nkx2-3 faktor szerepét kimutatták a colorektális miofibroblasztok identitásának fenntartásában is, amely révén valószínűleg a colon őssejtpopulációjának szabályozásában is szerepe lehet. (86)

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



2. ábra. Az Nkx2-3 fehérje expressziós mintázata humán colonban.

Az immunhisztokémiai jelölés formaldehid fixált paraffinba ágyazott biopsziából készült metszeteken történt. A referencia jelölés (piros) az endotél faktor VIII (balra fent), CD34 (jobbra fent), és miofibroblaszt-simaizom markerek (izom-specifikus aktin (MSA) (balra lent) és alfa-simaizom aktin α SMA (jobbra lent)) expresszióját mutatja. A kettős jelölésnek köszönhetően megfigyelhetjük a referencia markerek részleges átfedését az Nkx2-3 pozitív (barna magfestődés) sejtekkel; (scale bar 100 μ m).(73)

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 gyulladással járó 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

3.1 Kísérleti állatok

Az Nkx2-3^{-/-}, 129SvxB6 kevert hátterű 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. (75) A C57BL/6 hátterű MAdCAM-1^{-/-} (Madcam1^{tm1.2Nwag}) egértörzset Angela Schippers és munkatársai állították elő. (87) A BALB/cJ és C57BL/6J egerek a Jackson Laboratory-ból (Bar Harbor, USA) szereztük be. Kísérleteink során a korábban leírt mCD19CherryLuciferáz (CD19CL) transzgenikus egereket (88) és LacZ-Nkx2-3^{+/-} riportert egerekből származó mintákat (35) is felhasználtunk. A születéstől azonos környezeti feltételek biztosítása végett az Nkx2-3 hiányos egerek esetében kontrollként Nkx2-3 heterozigótákat használtunk. Az egereket a kísérletet megelőzően legalább egy hétig standard körülmények között tartottuk. Az élő állatokkal kapcsolatos valamennyi eljárást a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérletek Etikai Bizottsága által a BA02/2000-16/2015 számú engedélyben megfogalmazott iránymutatásoknak megfelelően, a géntechnológiával módosított szervezetek használatának a Vidékfejlesztési Minisztérium által kiadott SF/27-1/2014 számú engedélye alapján végeztük.

3.2 DSS kezelés

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

3.3 Antitestek és reagensek

Áramlási citometriás kísérleteinkhez a következő kereskedelemben kapható antitesteket és reagenseket használtuk fel: anti-CD3-allophycocyanin-Cy7 (145-2C11 klón; BD Biosciences), biotinált anti-CD11c (N418 klón; BioLegend), anti-Thy-1.2 (CD90.2)-PerCP/Cy5.5 (53-2.1 klón, BioLegend), Streptavidin PE-Cy7 (BioLegend), anti-ROR γ t-AlexaFluor647 (Q31-378 klón, BD Biosciences); (az intracelluláris festést a gyártói protokoll szerint végeztük el a BD Biosciences membrán permeabilizáló

pufferével). Az anti-CD3-FITC (KT3 klón), anti-CD19-FITC (1D3 klón), biotinált anti-CD45 (IBL-3/16 klón), anti-CD4-Cy3 (YTS191.1 klón), anti-CD4-AF647 (YTS191.1 klón) anti-CD45-CF647 (IBL-3/16 klón) antitestek előállítás és/vagy fluorokrómokkal konjugálása laboratóriumunkban (PTE-KK-IBI) történt.

Szöveti immunfluoreszcenciához a következő patkány IgG monoklonális antitesteket szintén laborunkban állítottuk elő -hibridóma felülűzők Protein G kromatográfiás tisztításával- és/vagy konjugáltuk: FITC-el konjugált anti-CD45 (IBL-3/16 klón), CF647-el jelölt anti-B220 (RA3-6B2 klón), TAMRA konjugált anti-Thy-1 (IBL-1 klón), anti-MAdCAM-1 (MECA-367 klón), CD21/35-FITC (7G6 klón). A kereskedelemben kapható anti-PNAd (MECA-79 klón; BD Biosciences), antitestet FITC konjugált anti-patkány IgG-vel (Vector Laboratories), a kecske anti-egér CXCL13-at (R&D Systems) számár anti-kecske FITC-el (Southern Biotech), a biotinált CD11c-t (N418 klón, BioLegend) pedig Streptavidin PE-el (BD Biosciences) vizualizáltuk.

Magfestéshez Hoechst 33342-t használtunk (Thermo Fisher Scientific, Budapest). A DyLight594-konjugált anti-PNAd (MECA-79 klón) Eugene C. Butcher (Stanford University) szívélyes felajánlása volt.

A perifériás nyirokcsomók szerkezetének meghatározásához a következő antitest köktélt alkalmaztuk: anti-CD21/35-FITC (7G6 klón, PTE-KK-IBI), anti-Thy-1-TAMRA és anti-B220-CF647.

ELISA-hoz torna peroxidáz konjugált anti-egér poliklonális antitetstet (Dako) használtunk.

3.4 Lamina propria limfocita izolálás

A lamina propria limfocitákat egy korábban leírt protokoll alapján izoláltuk. (89) A kísérleti egerek feláldozását követően a vékonybélről eltávolítottuk a Peyer plakkokat, majd a colonnal együtt hosszában felváltuk. A vékonybél és colon szakaszokat külön dolgoztuk fel, az egy és két hetes egerek esetében legalább 3 bélmintát pooloztunk. A mintákat hideg (4°C) PBS-ben alaposan átmostuk, majd mérettől és életkortól függően 10-20 percig rázattuk 110 rpm fordulatszámmal, 37°C-on, 10mM EDTA (Sigma Aldrich) tartalmú DMEM médiumban az intraepitél réteg eltávolítása céljából. A két bélszakaszt ezután többszöri hideg (4°C) PBS-ben vortexeléssel átmostuk, majd 3-5 mm-es darabokra vágtuk. A béldarabkákat 37°C-on

100 rpm-en rázatva emésztettük 0,6mg/ml kollagenáz D (Sigma Aldrich) és 5U/ml DNáz I (Sigma Aldrich) tartalmú DMEM médiumban. A felülúszót 70µm sejtszűrőn (Greiner Bio-One) átszűrve gyűjtöttük össze minden 20. perc után, majd friss médiumot adtunk a mintákhoz. A 20 perces inkubációkat addig ismételtük, amíg a béldarabok teljesen meg nem emésztődtek. A mononukleáris sejteket sűrűség grádiens centrifugálással szeparáltuk, 40% 80% (w/v) Percollal (Sigma Aldrich).

3.5 Áramlási citometria

A Percoll grádiens centrifugálás során szeparált sejteket PBS-ben mostuk, majd a következő antitestekkel sejtfelszíni jelölést végeztünk: anti-Thy-1.2 (CD90.2)-PerCP/Cy5.5 (53-2.1 klón, BioLegend), anti-CD3-FITC (KT3 klón, PTE-KK-IBI), anti-CD19-FITC (1D3 klón, PTE-KK-IBI), és biotinált anti-CD45 (IBL-3/16 klón, PTE-KK-IBI). A biotinált anti-CD45 antitestet Streptavidin PE-Cy7-el detektáltuk (BioLegend). Permeabilizációt követően az anti-RORγt-AF647-el (klón Q31-378, BD Biosciences) intracelluláris jelölést hajtottunk végre a gyártói protokoll szerint.

Az említettekén kívül az alábbi antitesteket használtuk fel áramlási citometriás vizsgálataink során ILC3/LTi sejtek azonosítására: anti-CD3-allophycocyanin-Cy7 (145-2C11 klón; BD Biosciences), anti-CD4-Cy3 (YTS191.1 klón, PTE-KK-IBI), anti-CD4-AF647 (YTS191.1 klón, PTE-KK-IBI), anti-CD45-CF647 (IBL-3/16 klón, PTE-KK-IBI).

A dendritikus sejtek azonosításához használt biotinált anti-CD11c (N418 klón, BioLegend) antitestet Streptavidin PE-Cy7 konjugátummal (BioLegend) detektáltuk.

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 és FlowJo szoftverek segítségével. Az ILC3 sejteket a következőképpen határoztuk meg: CD45⁺CD3⁻CD19⁻CD90/Thy1⁺RORγt⁺. Az eredményeket az ILC3 sejtek abszolút számaként mutatjuk be.

3.6 Szövettan

A SILT struktúrák összetételének meghatározásához posztnatális korban egy, két és négy hetes egerek colon és vékonybél szakaszaiból készült Swiss-rollokat készítettünk. A blokkokból 4-6, egymástól 100-200 µm távolságra lévő síkokban 8µm vastagságú kriosztát metszeteket készítettünk, melyeket fluoreszcenesen jelöltünk. A

vizsgálat sorána következő SILT struktúrákat különböztettük meg méretük, morfológiájuk valamint sejttöszetételük alapján: Thy-1⁺⁺/B220⁻ kriptomlakkok (CP), Thy-1⁺⁺/B220⁺ éretlen izolált nyiroktüszők (imILF) és Thy-1⁺/B220⁺⁺ érett ILF (matILF). Az immunofluoreszcens jelöléshez a kriosztát metszeteket 10 percig acetonban fixáltuk, majd 20 percig 5% BSA tartalmú PBS-el telítettük. A többszörös immunofluoreszcens jelölés során a metszeteket a következő monoklonális antitest koktéllal inkubáltuk 45 percig PBS-ben: FITC konjugált anti-CD45, TAMRA konjugált anti-Thy-1 és CF647 konjugált anti-B220. A jelölést 3x5 perc PBS-ben történő mosás, majd 1:1 arányú PBS-glicerinnel való fedés követte.

Fiatal felnőtt (8-10 hetes) egerekben szintén vizsgáltuk a SILT-ek megoszlását normál körülmények között, valamint DSS indukálta colitisben. A posztnatális SILT megoszlás elemzése során használt markerek mellett az ILF érettségi fokának pontosabb megkülönböztetése érdekében komplement receptor 2 (CR2) expressziójukat (anti-CD21/35-FITC, 7G6 klón) és peanut agglutinin lektin (biotinált PNA) jelölődésüket is vizsgáltuk immunfluoreszcens jelöléssel. Az éretlen ILF-eket CR2^{+/-} az érett ILF-eket pedig CR2⁺/PNA^{+/-} csoportként határoztuk meg, a biotinált PNA lektin kötődését streptavidin-Alexa 350 konjugátummal mutattuk ki. ILF-eknél vizsgáltuk továbbá a DC-ek jelenlétét is kecske anti-egér CXCL13-al (R&D Systems), melyet számár anti-kecske FITC-el (Southern Biotech), valamint biotinált CD11c-vel (N418 klón, BioLegend), melyet Streptavidin PE konjugátummal (BD Biosciences) detektáltunk.

Az intesztinális adresszin expresszió kimutatására a kriosztát metszeteket PBS-ben hígított 5µg/ml anti-MAdCAM-1 IgG-vel inkubáltuk, majd a mosás után FITC konjugált anti-patkány IgG-vel (BD Biosciences) detektáltuk. A metszeteket ezután 50x-esére hígított normál patkány szérummal telítettük, majd DyLight594-konjugált MECA-79 anti-egér PNA antitesttel és CF647-konjugált anti-egér CD45-el inkubáltuk.

A perifériás nyirokcsomók analíziséhez ágyéki nyirokcsomókból készítettünk medián síkú metszeteket. A folliculáris dendritikus sejteket FITC konjugált anti-CD21/35-el, a T-sejteket TAMRA konjugált anti-Thy-1-el, valamint a B-sejteket CF647 konjugált anti-B220 monoklonális antitesttel detektáltuk. Az eredményeket a metszetek 1:1 arányú PBS-glicerines fedését követően Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A reprezentatív képeket az Olympus Fluo-View FV-1000 lézer scanning konfokális képalkotó rendszerrel készítettük.

A MAdCAM-1 és PNA_d egyszeres jelöléséhez 1-2 és 4 hetes egerekből származó aceton fixált vékonybél és colon kriosztát metszeteket 1µg/ml anti-MAdCAM-1 vagy anti PNA_d monoklonális antitestekkel inkubáltuk. A jelöléseket FITC-konjugált anti-patkány IgG-vel (vector Laboratories) tettük láthatóvá, végül a fedéssel együtt Hoechst 33342 magfestést végeztünk. A jelölés intenzitásának számszerűsítéséhez az ImageJ szoftvert használtuk. Az eredményeket relatív pixel intenzitásként (mean grey value) tüntettük fel.

A DSS-kezelt egerek szövettani értékeléséhez colon Swiss-roll kriosztát metszeteket használtunk. A hematoxilin-eozin festést a PTE Patológia Intézetében végezték standard eljárás szerint. A minták hisztopatológiai kiértékelését egy gyakorlott patológus végezte egy korábban leírt protokoll alapján (90) a szubmukózális ödéma (0-3), polimorfonukleáris sejt infiltráció (0-4), kehely sejtek számának (0-3) és epitél integritás (0-3) vizsgálatával.

3.7 B-sejt-kolónia analízis teljes vastagbél biolumineszcenciával

A B-sejtek globális bél-megoszlásának vizsgálatára Nkx2-3^{-/-} egérrel keresztezett mCD19CherryLuciferáz (CD19CL) transzgenikus egereket használtunk fel. Az egereket 50mg/kg nátrium pentobarbitállal történő intraperitoneális oltással altattuk el, majd steril PBS-ben feloldott (15 mg/ml), 150mg/kg D-luciferinnel (Gold Biotechnology) intravénásan oltottuk. Az egereket 10 perccel az oltást követően áldoztuk fel, colonjukat eltávolítottuk, hosszában felvágtuk, majd egy petri csészére helyezve azonnal az IVIS Lumina II (perkinElmer) képalkotó rendszerbe helyeztük, 37°C hőmérsékletre. A képalkotás az oltást követő 15 perces időtartamon belül történt 180 másodperces felvételi idővel. Az adatok elemzése a Living Image szoftverrel történt (PerkinElmer). A releváns tartományok (ROI) automatikus meghatározása egyedi lumineszcencia küszöbértékük alapján történt. Minden mintában meghatároztuk a ROI-k számát, a ROI-k teljes radiancia, lumineszcencia (teljes foton flux/másodperc) és terület (négyzetmilliméter) értékeit.

3.8 Immunizálás és ELISA

Az anti-ovalbumin válasz indukálásához a MAdCAM-1^{-/-} és vad típusú C57BL/6J egereket 50µl 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 áldoztuk fel. Az anti-OVA IgG válasz meghatározására ELISA lemezeket (Nunc Maxisorp, Thermo Scientific) 5µg/ml ovalbumin (Sigma-Aldrich, Budapest) koncentrációjú PBS-ben egy éjszakán át érzékenyítettük, majd egy órán át 0,1% zselatin PBS- 0,1% Tween-20-al (Sigma-Aldrich, Budapest) telítettük 37°C-on. A telítést PBS-Tween-el történő mosás követte. Ezt követően a lemezeket az egerek hígított szérumaival, majd mosás után tormaperoxidáz konjugált nyúl anti-egér Ig poliklonális antitesttel inkubáltuk. A peroxidáz aktivitást citrát-foszfát pufferben (pH:5.0) ortho-feniléndiaminnal és H₂O₂-al (Sigma-Aldrich, Budapest) detektáltuk. A reakciót 4M-os H₂SO₄-el leállítottuk, a mintákat duplikátumokban, 492 nm-en mértük le.

3.9 RNS izolálás, cDNS írás, RT-PCR

A teljes RNS izolálása a NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel GmbH) RNS izoláló kit-el történt az egerek ágyéki és mezenterialis nyirokcsomójából, Peyer plakkjából és disztális colonjából készült homogenizátumból. Az így nyert RNS minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop készülékkel elemeztük. A mintákból ezt követően a High Capacity cDNA RT Kit (Life Technologies) segítségével cDNS-t szintetizáltunk. A valós idejű PCR-t ABI-PRISM 7500 géppel duplikátumokban futtattuk le a már korábban leírt SYBR green primerekkel (80), vagy TaqMan próbákkal (mGAPDH, mIL-22, mRegIIIβ, mRegIIIγ, mMuc2). Az eredményeket a β-actin, vagy az mGAPDH housekeeping gének százalékaként tüntettük fel.

3.10 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 minták koncentrációját standard görbe alapján határoztuk meg.

3.11 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 150µg anti-IL22 monoklonális antitesttel (8E11 klón, Genentech), vagy izotípus kontrollal (GP120:9709; Genentech) intraperitoneálisan oltottuk. Az

egereket a hetedik napon áldoztuk fel, colonjaikat szövettani és áramlási citometriás analízisre használtuk fel.

3.12 Csontvelő kimérák előállítása

A négy hetes eGFP-tgBALB/c egereket a PTE Onkoterápiás Intézetében 2 x 5,5 Gy letális dózissal sugaroztuk be Co⁶⁰forrásból, 6 órás intervallumokban. Az egerek ezt követően 5 x 10⁶ contvelő sejtet kaptak BALB/c vagy Nkx2-3^{-/-} egerekből 3 órával a második besugárzást követően. A sejteket 200µl DMEM médiumban a farok vénába oltottuk be. Az egerek 2 hétig ciprofloxacín tartalmú ivóvizet kaptak. A kimérizmus mértékét heparinnal alvadásgátolt vér Ficoll-izolálása után nyert PBMC eGFP/CD45 expressziója alapján határoztuk meg.

3.13 Kombinált LacZ/ β -galaktozidáz enzim és immunhisztokémia

A LacZ-Nkx2-3 riporter (91) és BALB/c egerek vastagbeléből készült Swiss-roll kriosztát metszeteket aceton-fixálását követően az endogén peroxidáz aktivitást 1mg/ml fenil-hidrazin-hidrokloriddal gátoltuk, majd PBS-ben történő mosás után 5% BSA tartalmú PBS oldattal telítettük. A metszeteket ér-asszociált fehérje-1 (VAP-1) antigén (7-88/1, Dr. S. Jalkanen szívélyes felajánlásából), EpCAM (G8.8 klón), IBL-20 endotél marker (PTE-KK-IBI) elleni és kontroll patkány IgG monoklonális antitestekkel inkubáltuk 5µg/ml koncentrációban. Az antitesteket ImmPRESS-HRP kecske anti-patkány IgG kit-el detektáltuk DAB/H₂O₂-vel a gyártói protokoll alapján. Mosást követően a mintákat 5mM K-hexacianoferrát, 5 mM K-ferrocianid és 2 mM Mg-klorid (Sigma Aldrich) tartalmú PBS-ben feloldott 1mg/ml X-gal-ban (Boehringer-Mannheim) egy éjszakán át inkubáltuk 37°C-on.

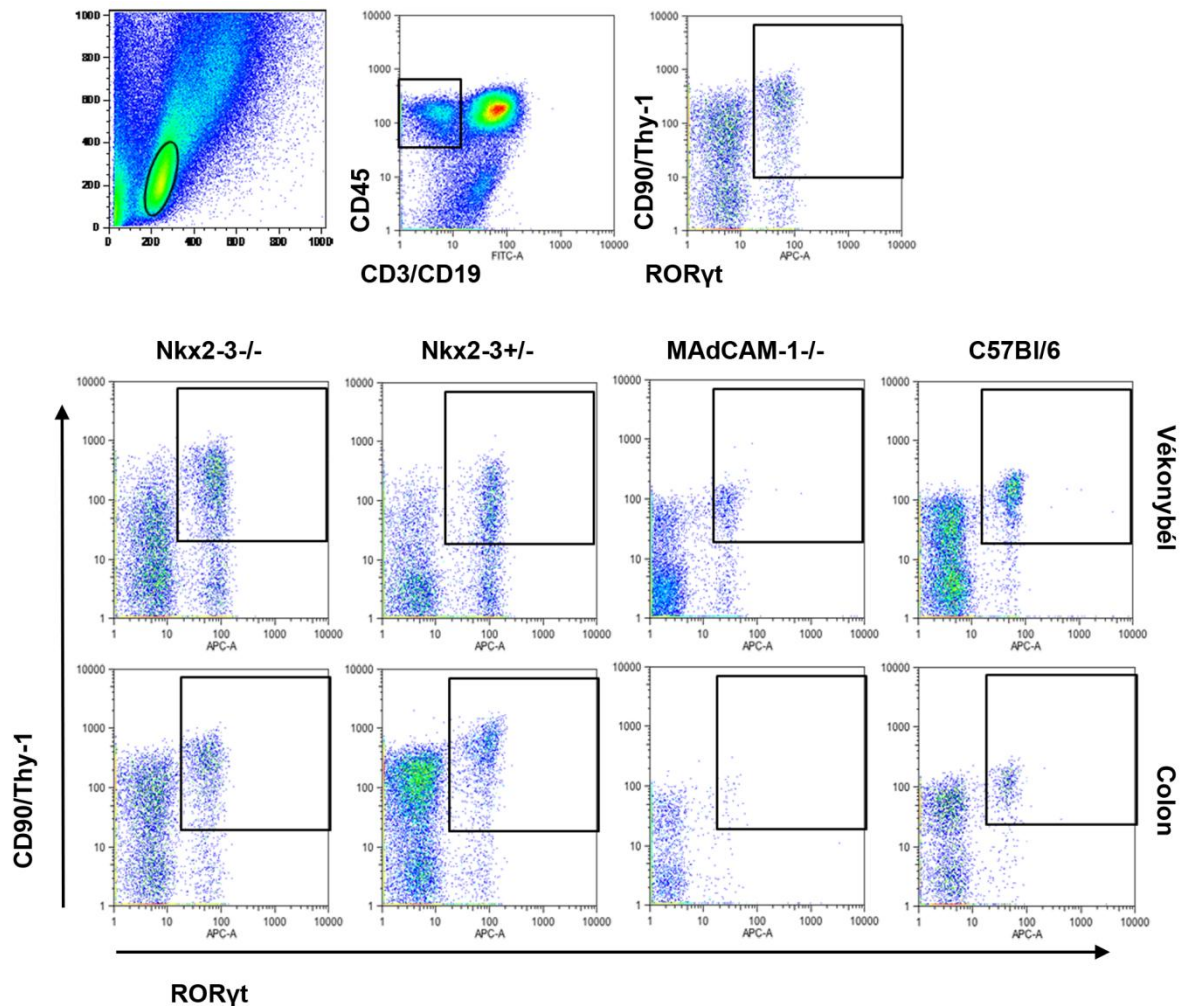
3.14 Statisztikai analízis

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. (3. ábra)



3. ábra. ILC3 sejtek azonosítása áramlási citometriával.

ILC3 populációként a limfoid kapun belül (fent balra (FSC-SSC ellipszis)), a CD45⁺, nem-T/B sejtek közül (fent középen (négyzet)) a CD90/RORγt kettős pozitív (fent jobbra (négyzet)) sejteket azonosítottuk; (4 hetes C57BL/6 egér vékonybél). ILC3 sejtpopuláció azonosítása reprezentatív vékonybél és colon mintákban Nkx2-3^{-/-}, Nkx2-3^{+/-}, MAdCAM-1^{-/-} és C57BL/6 egerekben; (lent).

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

A vékonybélben az első posztnatális héten volt a legmagasabb az ILC3 sejtek száma. Nkx2-3 hiányos egerekben nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést heterozigóta társaikhoz viszonyítva. Habár a MAdCAM-1^{-/-} csoportban sokkal alacsonyabb volt az siILC3 sejtek száma a vad típusú C57BL/6 kontrollhoz képest, ez a csökkenés sem volt szignifikáns.

A második hétre mindegyik vizsgált egértörzsben jelentősen csökkent az siILC3 szám. Érdekes módon ebben az időpontban az Nkx2-3^{-/-} egerekben volt a legtöbb és a MAdCAM-1^{-/-} törzsben a legkevesebb siILC3 sejt.

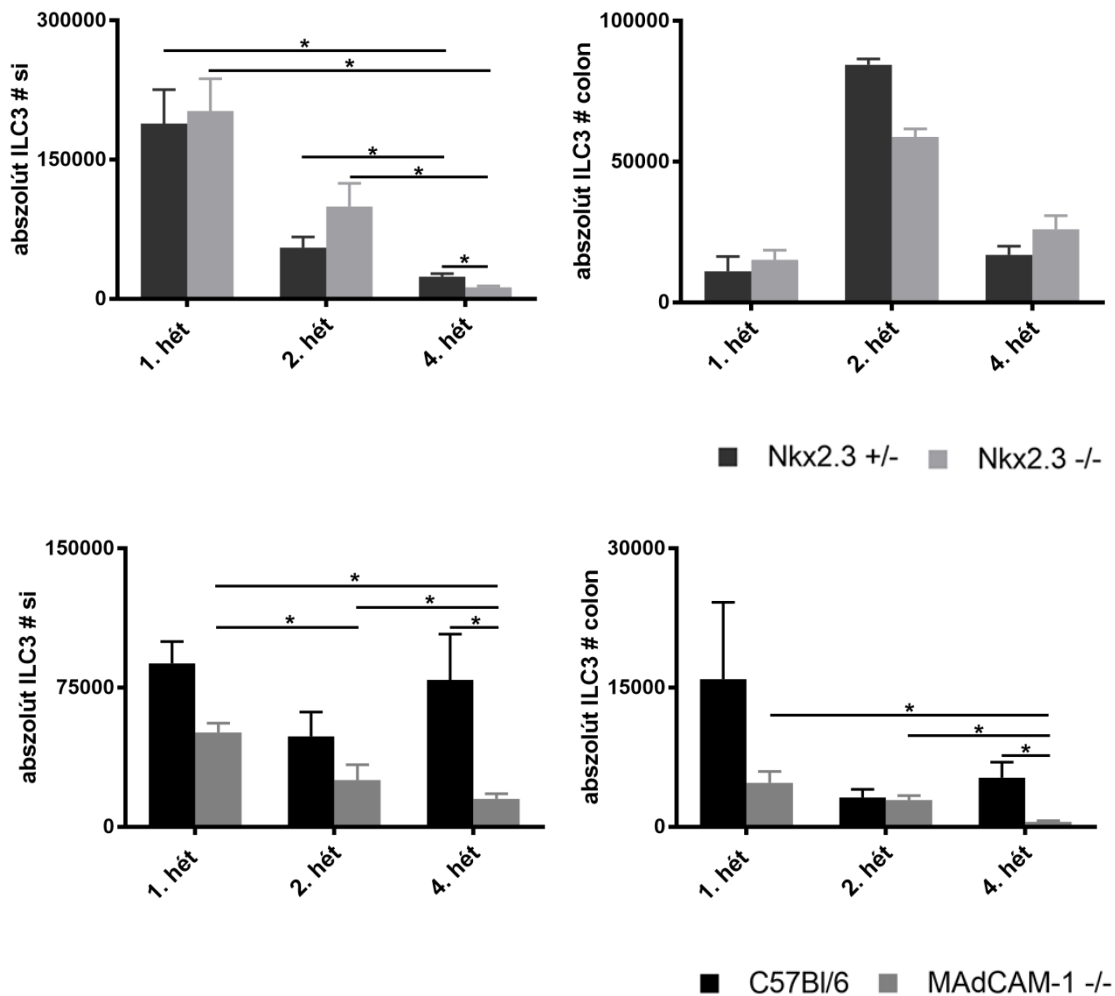
A negyedik hétre a C57BL/6 egerek kivételével, ahol az siILC3 szám kis mértékben emelkedett, minden törzsben további csökkenést figyelhettünk meg a második posztnatális héten tapasztaltakhoz képest. Ebben az időpontban Nkx2-3^{-/-} egerekben szignifikánsan alacsonyabb siILC3 számot figyeltünk meg, Nkx2-3^{+/-} 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 az Nkx2-3^{+/-}, C57BL/6 és Nkx2-3^{-/-} törzsek is hasonló ILC3 (cILC3) megoszlást mutattak, a MAdCAM-1^{-/-} egerekben viszont ennek csak a harmada volt a cILC3 abszolút sejtszám.

A második posztnatális héten Nkx2-3^{+/-} és Nkx2-3^{-/-} egerekben a cILC3 sejtek száma nagyjából négyszeresére emelkedett, ezzel ellentétben a cILC3 abszolút szám a C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} egerekben csökkent.

A negyedik hétre az Nkx2-3 deficiens és heterozigóta egerekben is jelentősen csökkent a cILC3 szám, ennek ellenére abszolút számuk még mindig magasabb volt, mint az első héten. 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, a C57BL/6 egerekben viszont az első héten mérthez hasonló számú cILC3 volt jelen. (4. ábra)



4. ábra. Lamina propria ILC3 sejtek posztnatális megoszlása a bélben.

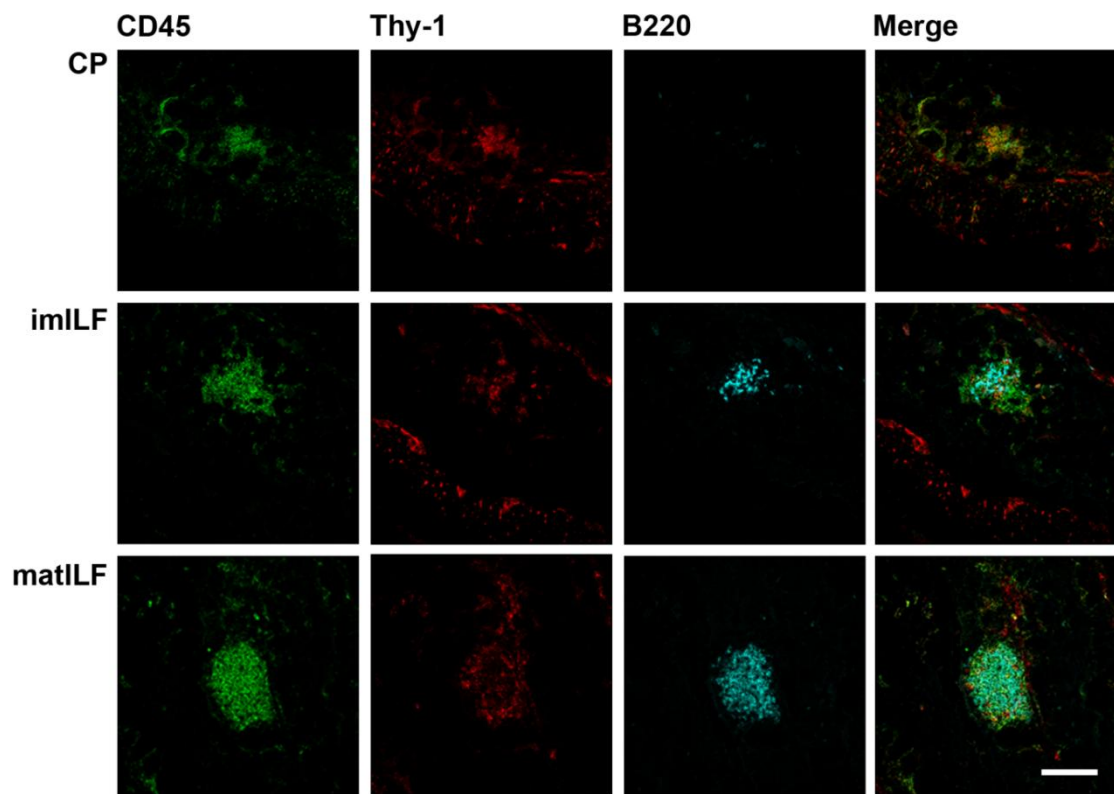
ILC3 sejtek abszolút száma a vékonybélben és a colonban (si: vékonybél, balra; colon: jobbra) Nkx2-3^{+/-} és Nkx2-3^{-/-} (fent), valamint MAdCAM-1^{-/-} és C57BL/6 (lent) egerekben, különböző posztnatális korokban; (n=3-7, átlag±SEM, *p < 0,05).

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 PNAd-re váltásával magyarázható. (83) 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 anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint, emellett az éretlen és érett ILF-ek (imILF, matILF) megkülönböztetéséhez morfológiai szempontokat is figyelembe vettünk. A nagyobb, kompaktabb szerkezetű, gyakran B220⁺ csíracentrummal rendelkezőket matILF-ként, a kisebb, kevesebb B220⁺ sejtet tartalmazókat pedig imILF-ként azonosítottuk. (5. ábra)



5. ábra. SILT variánsok posztnatális korban.

Reprezentatív kriptomlakk (CP), éretlen (imILF) és érett (matILF) izolált nyiroktüsző minták azonosítása 4 hetes Nkx2-3^{+/-} egér colonból, CD45/Thy-1/B220 többszörös immunfluoreszcens jelöléssel; (scale bar= 100 μ m).

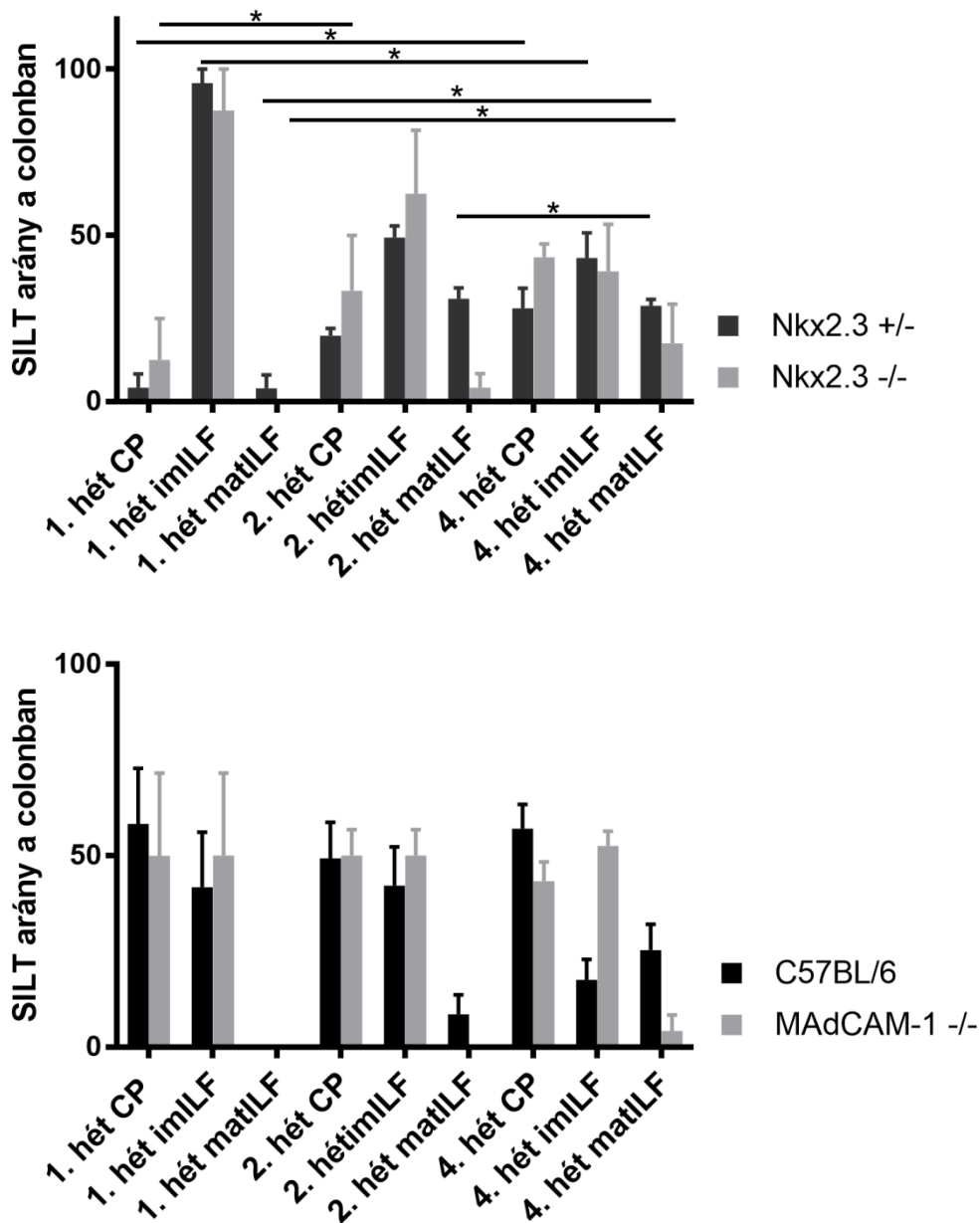
Az első posztnatális héten minden vizsgált egértörzsben csak CP-ok és imILF-ek voltak megfigyelhetők, melyek aránya Nkx2-3^{-/-} és MAdCAM-1^{-/-} egerekben is a kontroll csoportjaikban megfigyeltekhez hasonló megoszlást mutatott. Érdekes módon a

C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} egerekben a CP arány magasabb, az imILF arány viszont minden törzsben szinte azonos volt.

A második héten a MAdCAM-1^{-/-} egerek kivételével minden törzsben megjelentek a matILF-ek, viszont arányuk Nkx2-3 hiányában jóval alacsonyabbnak bizonyult. A CP és imILF arányokban nem volt szignifikáns eltérés az Nkx2-3^{-/-} és Nkx2-3^{+/-}, valamint MAdCAM-1^{-/-} és C57BL/6 egerek között, viszont az első héten megfigyeltékhez hasonlóan C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} egerekben magasabb volt a CP-ok aránya, az imILF arány pedig minden törzsben hasonló volt ebben az időpontban is.

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. MAdCAM-1^{-/-} egerekben magasabb imILF és alacsonyabb CP arányt figyeltünk meg, mint a C57BL/6 vad típusú törzsben, Nkx2-3^{-/-} egerekben pedig heterozigóta alomtársaikéval azonos imILF, valamint magasabb CP arányt tapasztaltunk. **(6. ábra)**

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a MAdCAM-1 hiány eltérő formái (Nkx2-3^{-/-} esetén transzkripcionális, MAdCAM-1^{-/-} esetén genomiális) különböző módon befolyásolják a SILT fejlődést a colonban. Nkx2-3 hiányában a SILT érés csak kis mértékben mutatott eltérést a kontroll csoporthoz képest, viszont a MAdCAM-1 globális 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 mukózális 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.



6. ábra. Posztnatális SILT megoszlás a colonban.

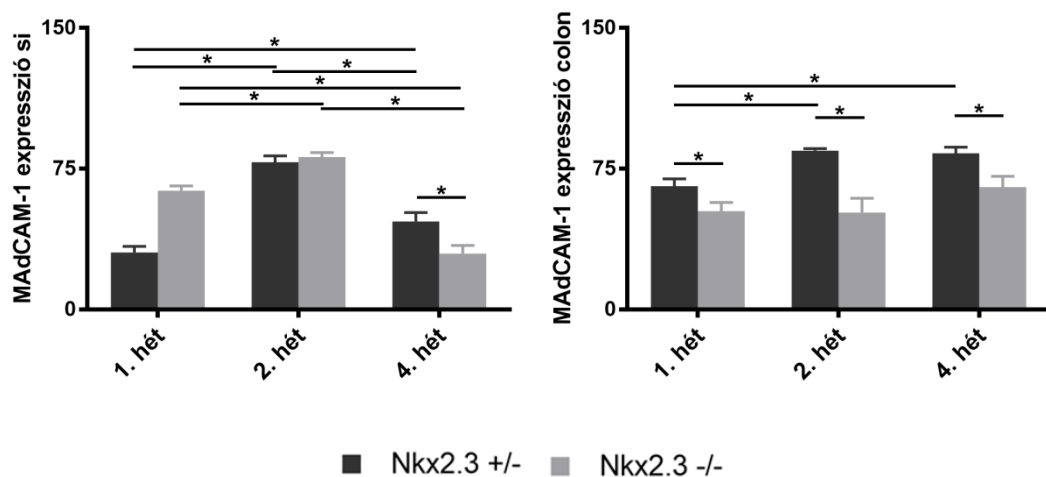
SILT struktúrák százalékos aránya Nkx2-3^{+/-} (sötétszürke) és Nkx2-3^{-/-} (világosszürke), (fent), valamint C57BL/6 (fekete) és MAdCAM-1^{-/-} (világosszürke) (lent) egerekben 1, 2 és 4 hetes korban; n=4; átlag ± SEM, *p < 0,05).

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 egyhetes egerekben, amely (ugyan kis mértékben) a második posztnatális héten is magasabbnak bizonyult az Nkx2-3 heterozigótákban megfigyeltékhez képest, viszont a negyedik hétre a MAdCAM-1 expresszió szignifikánsan 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. (7. ábra)



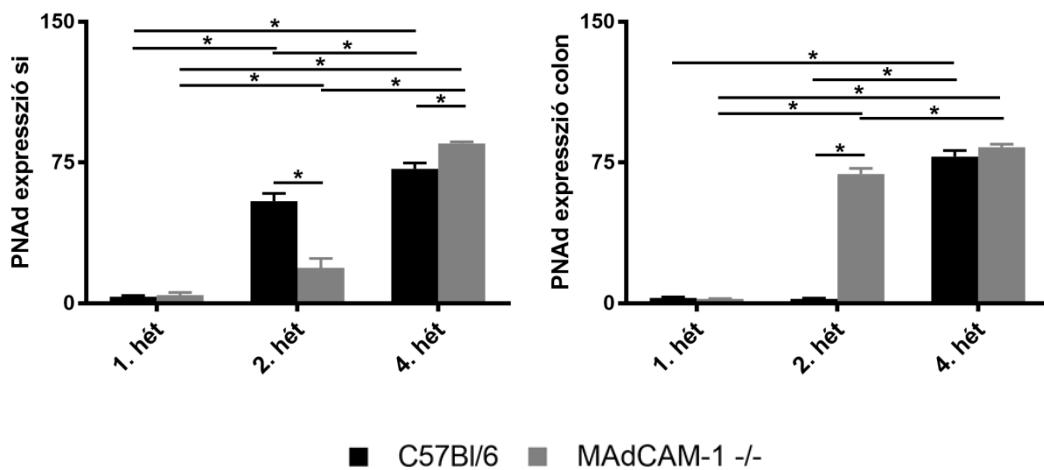
7. ábra. Posztnatális endotél adresszin expresszió kvantifikálása.

MAdCAM-1 jelölés relatív pixel intenzitása ("mean grey value", y-tengely) a vékonybélben (si; balra) és a colonban (jobbra), Nkx2-3^{+/-} (sötétszürke) és Nkx2-3^{-/-} (világosszürke) egerekben az 1., 2. és 4. posztnatális héten. (n=5, átlag± SEM, duplikátumokban mérve; *p < 0,05).

A MAdCAM-1^{-/-} egerek vékonybélében a PNAd expresszió kismértékű emelkedését figyeltük meg a második posztnatális hétre, de szintje így is a kontroll C57BL/6 csoporté alatt maradt. Ezzel szemben a negyedik hétre a PNAd expresszió szignifikánsan emelkedett MAdCAM-1 hiányában, és meghaladta a kontroll csoportban mért értéket. Az ILC3 sejtek száma a C57BL/6 egerek vékonybélében 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 (C57BL/6-tól eltérő kinetikájú) emelkedése mellett.

A colon PNAd expressziója MAdCAM-1^{-/-} egérben már a második hétre szignifikáns növekedést mutatott a kontroll csoporthoz képest, mely tovább emelkedett a negyedik hétig. (8. ábra) 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.



8. ábra. Posztnatális endotél adresszin expresszió kvantifikálása.

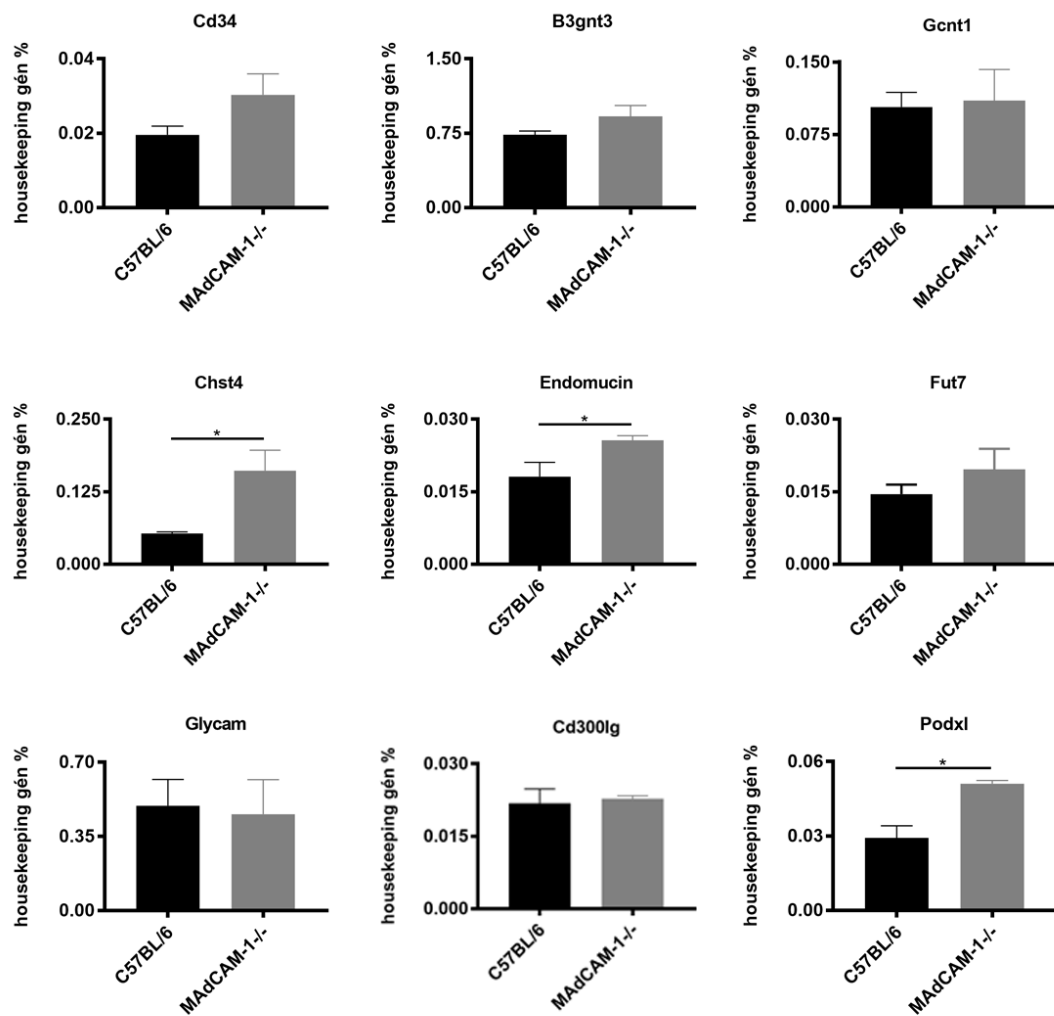
PNAd jelölés relatív pixel intenzitása ("mean grey value", y-tengely) a vékonybélben (si; balra) és a colonban (jobbra), C57BL/6 (fekete) és MAdCAM-1^{-/-} (világosszürke) egerekben az 1., 2. és 4. posztnatális héten; (n=5, átlag ± SEM, duplikátumokban mérve; *p < 0,05)

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 a PP-okban számos PNAd core fehérje és módosító enzim mRNS szintje megemelkedik, melyek endotél sejtjei nem expresszálják MAdCAM-1-et. (83) Az Nkx2-3 deficiens egerekben megállapítottakat követően arra voltunk kíváncsiak, hogy MAdCAM-1^{-/-} egerekben is hasonló eltéréseket találunk-e. Ehhez 8-10 hetes MAdCAM-1 deficiens és vad típusú C57BL/6 egerek PP-jaiból származó cDNS mintákat qPCR-al vizsgáltuk. 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, amely a MECA-79 PNAd epitóp kiemelkedő expresszióját eredményezte. (9. ábra) 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. (83)

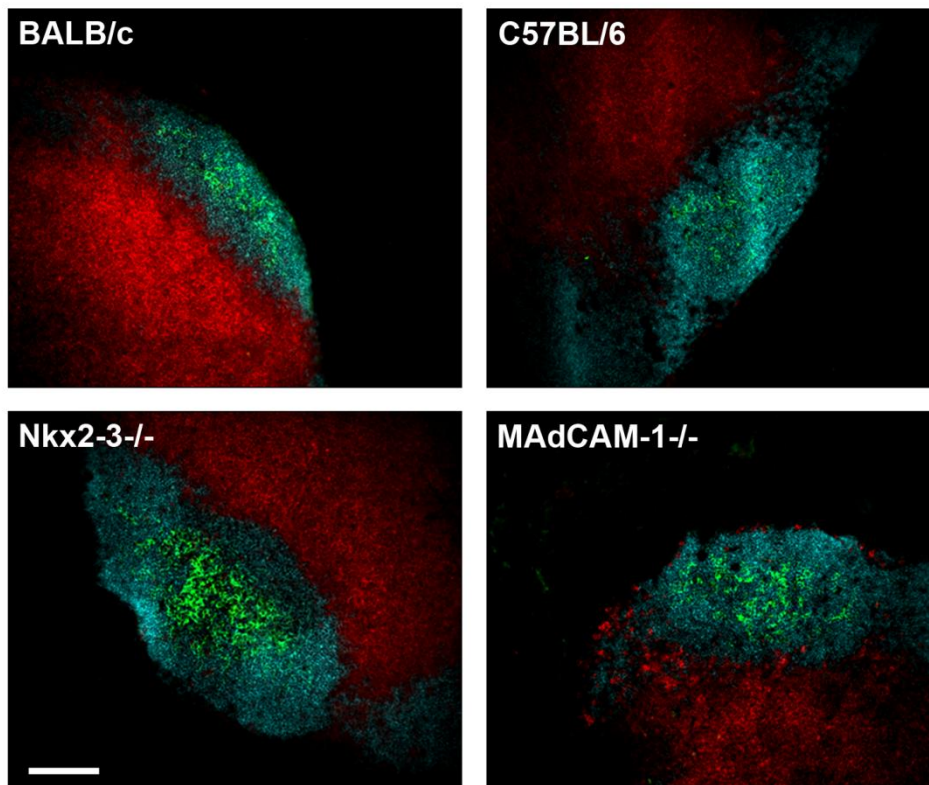


9. ábra. PNAd core fehérjék és glikozilációs enzimek mRNS expressziója.

A Peyer-plakkokban a core proteineken (GlyCAM, endomucin, podocalyxin-like protein, CD34 és nepmucin) és glikozilációs enzimeken végzett qPCR analízise, β -actinhez viszonyított mRNA szintben kifejezve; (n=6; átlag \pm SEM, duplikátumokban mérve; *p < 0,05).

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 expresszálják, amely a limfoid sejteken található $\alpha 4\beta 7$ integrint ismeri fel. (47, 92) Ennek kapcsán az Nkx2-3 és MAdCAM-1 különböző fokú hiányának (a SILT-eknél tapasztaltakhoz hasonlóan) a pLN kialakulására és szerkezeti érésére gyakorolt hatását vizsgáltuk. A T-, B- és dendritikus sejtek immunfluoreszcens jelölésével vizsgáltuk fiatal felnőtt (6 hetes) egerek pLN-it. A vizsgálat során sem a limfoid kompartmentalizációban sem pedig a folliculáris strómális szerveződésben nem találtunk eltéréseket. (10. ábra)



10. ábra. Megtartott nyirokcsomó szerkezet MAdCAM-1 hiányában.

6 hetes BALB/c, Nkx2-3^{-/-}, C57BL/6, és MAdCAM-1^{-/-} egerek reprezentatív ágyéki nyirokcsomó kriosztát metszetei B- (B220/türkiz), T- (Thy-1/vörös), és folliculáris dendritikus sejtekre (CD21/35/zöld) jelölve. A jelölést kétszer végeztük el; (scale bar: 100 μ m).

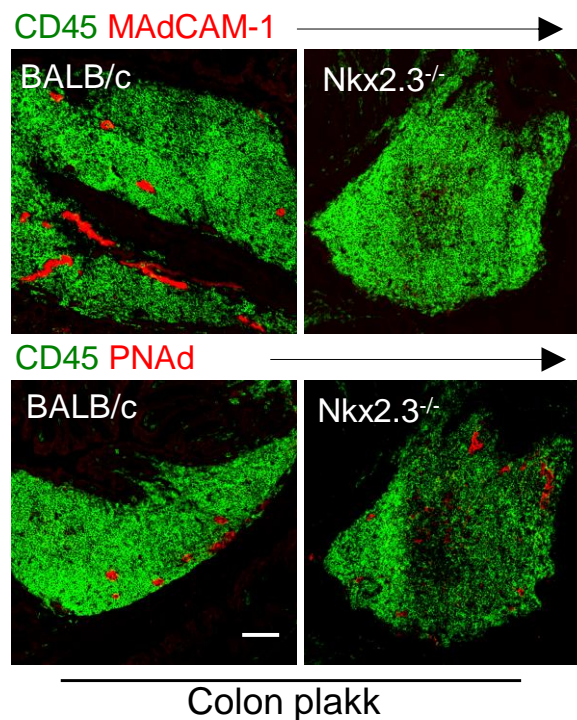
Ezt követően a helyi T-dependens immunválasz eltéréseit vizsgáltuk Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányos egerekben. Az egereket két alkalommal oltottuk ovalbuminnal az anyagok és módszerek részben ismertett eljárás szerint. Az egerek szérumát a 21. napon gyűjtöttük össze, majd az anti-OVA IgG válasz vizsgálatára indirekt ELISA

tesztet végeztünk. 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 T-dependens antitest válasz is megtartott MAdCAM-1 hiányában.

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. (11. ábra)

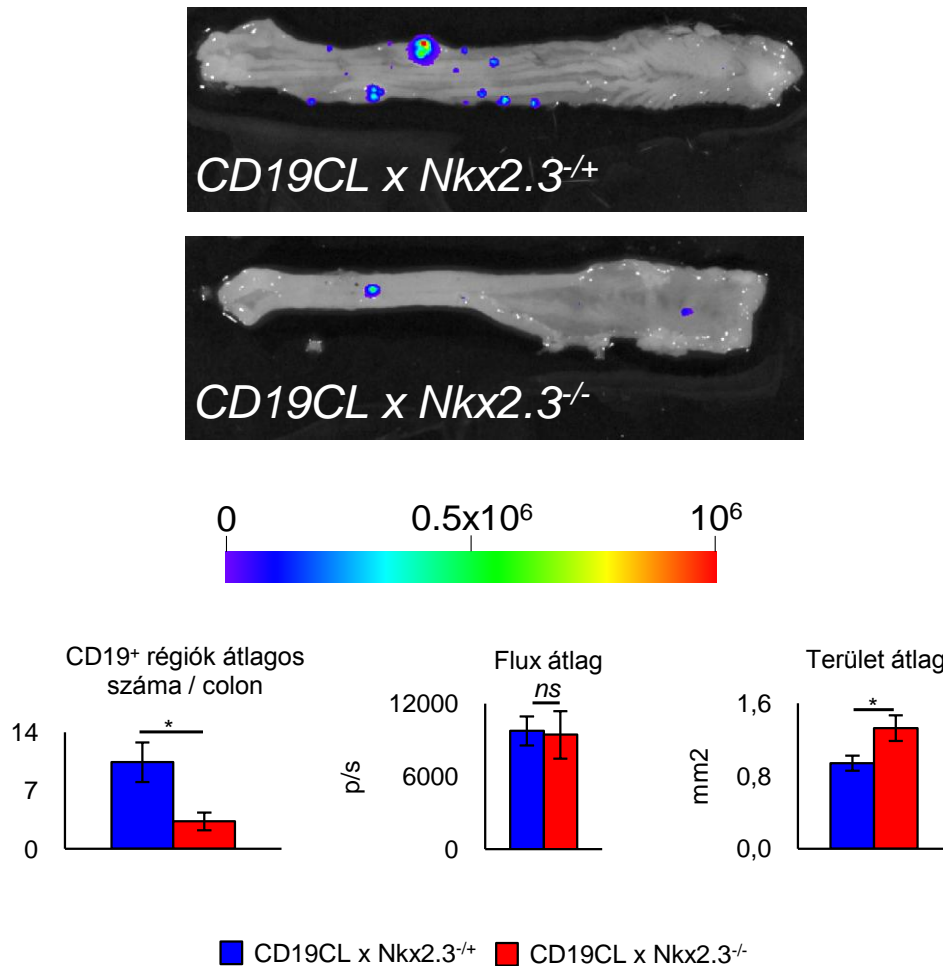


11. ábra. Megváltozott adresszin mintázat Nkx2-3^{-/-} colonban.

A BALB/c és Nkx2-3^{-/-} colon metszeteken a MAdCAM-1 (vörös, fent) és CD45 (zöld), vagy PNAd (vörös, lent) és CD45 (zöld) markereket jelöltük; legalább 5 egéren végzett immunofluoreszcens jelölés reprezentatív képei; (scale bar 250 μ m).

Ezt követően Nkx2-3^{-/-} és CD19CL transzgenikus egereket -melyek B-sejtjei luciferáz aktivitással bírnak- kereszteztünk, hogy a B-sejtes klaszterek megoszlását a teljes colonban vizsgálni tudjuk Nkx2-3 faktor-deficiens állatokban. Az ex-vivo kísérlet során Nkx2-3^{-/-} x mCD19Luc⁺ egerekben szignifikánsan alacsonyabb számú B-sejtes

klaszter volt megfigyelhető, mint heterozigóta ($Nkx2-3^{+/-}$ x $mCD19Luc^{+}$) társaikban. A vizsgált régiók átlagos flux értékében (foton/másodperc) nem találtunk eltérést, valamint $Nkx2-3^{-/-}$ egerek esetében a B-sejtes klaszterek területe szignifikánsan nagyobbak bizonyult a heterozigóta kontroll csoportban mértékhez képest. (12. ábra)



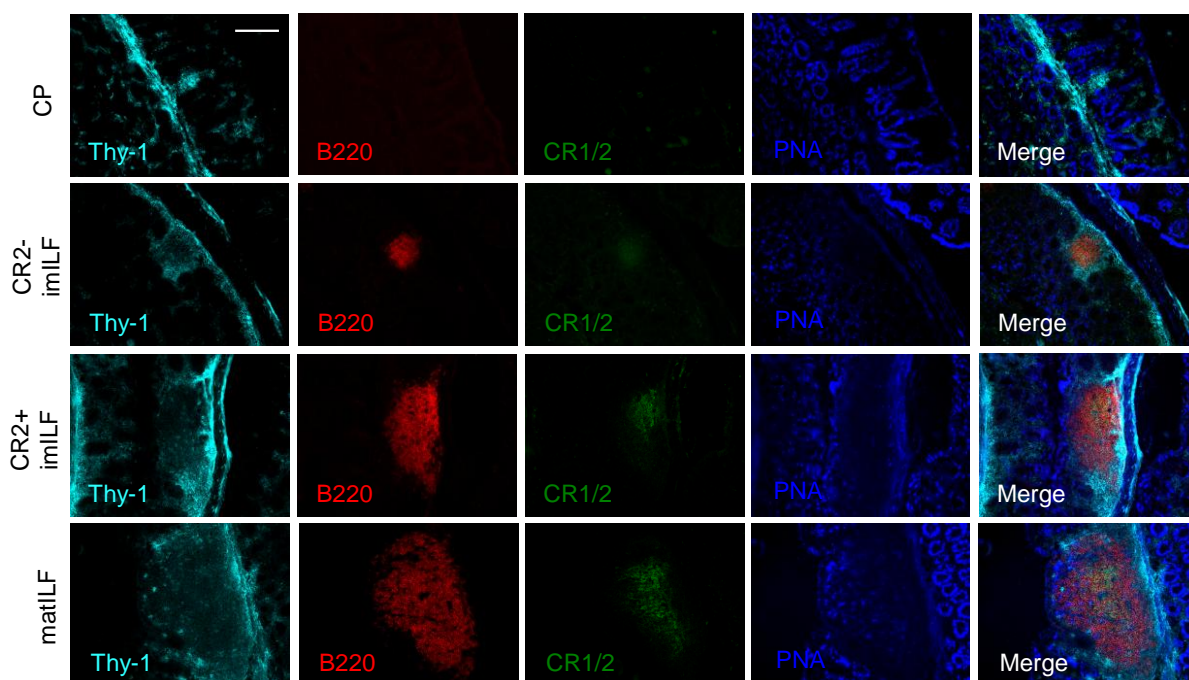
12. ábra. B-sejt csoportosulás meghatározása luciferáz-aktivitás alapján.

Reprezentatív képek $CD19CLxNkx2-3^{+/-}$ és $CD19CLxNkx2-3^{-/-}$ egerek colonjáról (fent). A B-sejtes régiók átlagos száma (lent balra), fényerőssége (flux) (lent középen) és átlagos területe (jobbra lent) $CD19CLxNkx2-3^{+/-}$ és $CD19CLxNkx2-3^{-/-}$ colonokban; (n=3-5 egér/csoport, átlag \pm SEM, * $p < 0,05$, ns= nem szignifikáns).

A colonban található SILT struktúrák felnőttkori megoszlásának vizsgálatára Swiss-roll metszeteken immunfluoreszcens jelölést végeztünk. A SILT struktúrákon belül az alábbi érési stádiumokat különböztettük meg:

- kriptoplakkok (CP; $Thy1^{+}/B220^{-}$),
- éretlen ILF (imILF; $Thy-1^{+/-}/B220^{+}$),
- imILF FDC-vel ($B220^{+}/CR2^{+}$ ($CD11c^{+}$, $CXCL13^{+}$)),

- érett ILF (matILF csíracentrummal; B220⁺/CR2⁺/PNA⁺) (**13. ábra**).

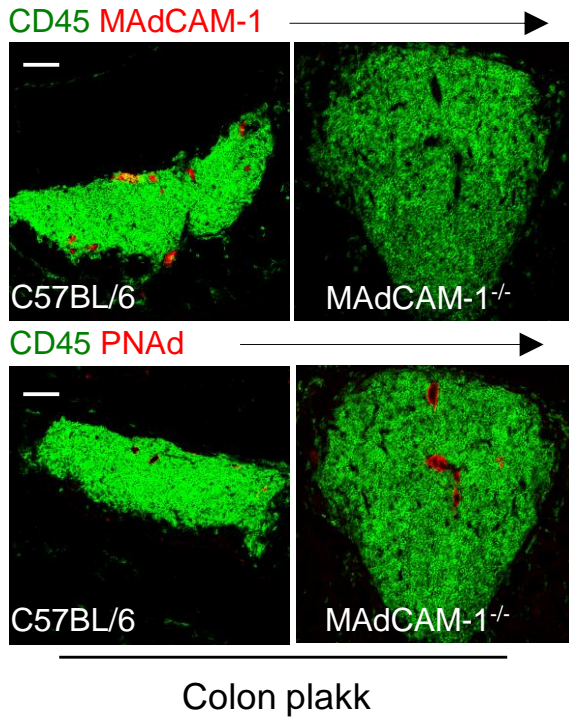


13. ábra. SILT analízis felnőtt egerekben.

Colon mintából készült Swiss-rollokból négy, egyenlő távolságban elhelyezkedő kriosztát metszetet festettünk meg Thy-1 (ciánkék), B220 (vörös), CR1/2 (zöld), és PNA (kék) elleni antitestekkel; (reprezentatív képek, n=3-10 festés/genotípus/csoport; (scale bar 250 μ m).

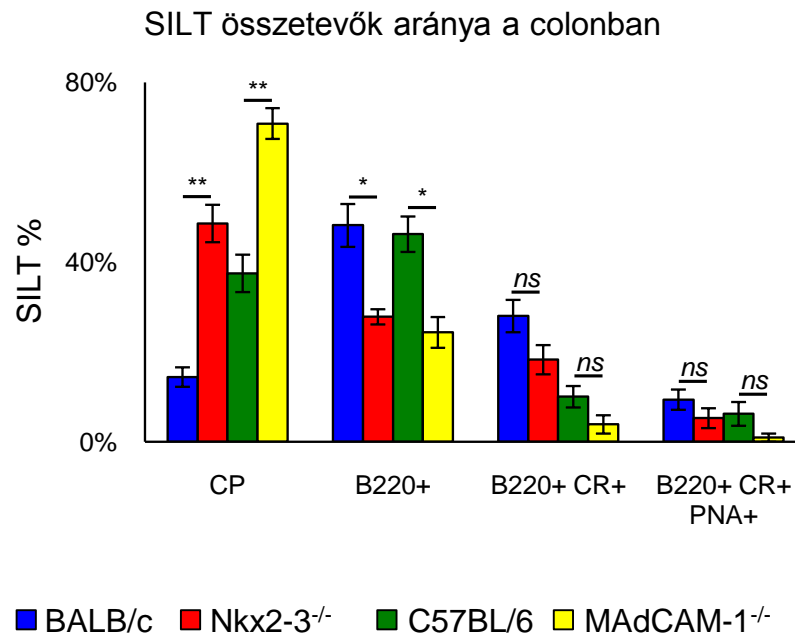
Nkx2-3 hiányában normál struktúrájú SILT-eket találtunk a colonban, viszont az éretlen formák nagyobb arányban voltak jelen, mint a kontroll csoportban. A CP-ok aránya Nkx2-3^{-/-} egerekben jóval magasabb volt (48,6%), mint BALB/c egerekben (14,4%). A CD11c⁺ DC nélküli imILF-ek aránya Nkx2-3 hiányában 27,8%, BALB/c-ben 48,2%, az FDC-t tartalmazó imILF-ek aránya pedig 18,3% volt Nkx2-3^{-/-}, és 28,0% BALB/c egerekben. A matILF-ek aránya 5,3% volt Nkx2-3^{-/-}, és 9,4% volt BALB/c egerekben. Ezekből az értékekből megállapíthattuk, hogy 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. MAdCAM-1^{-/-} hiányában szintén megfigyeltük a PNA⁺ luminális megjelenését a ColP HEV-eken. (**14. ábra**) MAdCAM-1^{-/-} egerekben a SILT-ek struktúrális elváltozást nem mutattak, viszont a CP-ok imILF és matILF fázisokba történő érésének sokkal nagyobb mértékű gátlását figyeltük meg. (**15. ábra**)



14. ábra. Megváltozott adresszin mintázat MAdCAM-1^{-/-} colonban.

A C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} colon metszeteken a MAdCAM-1 (vörös, fent) és CD45 (zöld), vagy PNA (vörös, lent) és CD45 (zöld) markereket jelöltük; legalább 5 egéren végzett immunfluoreszcens jelölés reprezentatív képei; (scale bar 250 μ m).

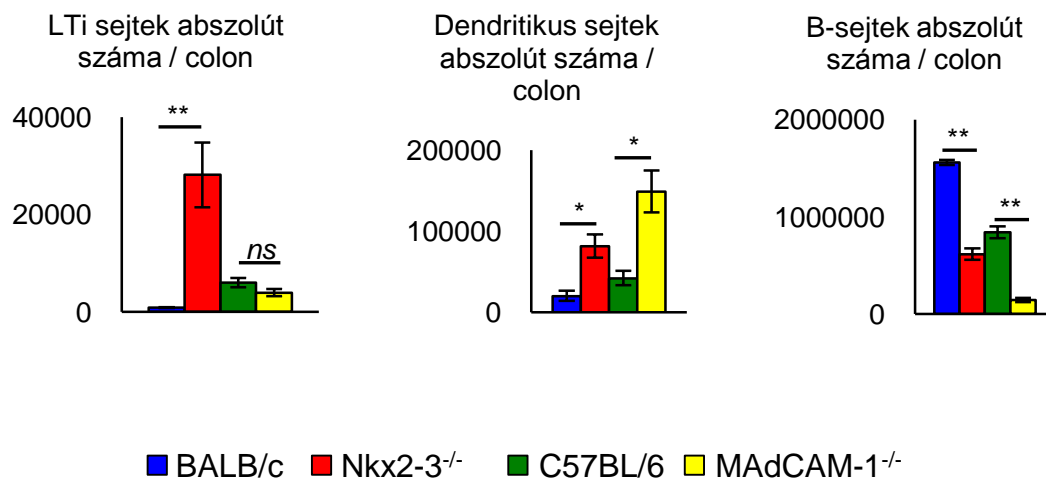


15. ábra. SILT struktúrák megoszlása felnőtt korban.

BALB/c, Nkx2-3^{-/-}, C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} colon Swiss-rollokból 4 síkban készült metszeteket immunfluoreszcensen jelöltük Thy-1, B220, CR1/2, és PNA elleni antitestekkel. (n=5-7 egér/genotípus, átlag \pm SEM, *p < 0,05; **p < 0,005 ns: nem szignifikáns).

A CP-ILF átalakulás során a felnőtt LTi szerű ILC sejtek és a CXCL13 termelő DC-ek B-sejtekre cserélődnek. (93) A colon lamina propria sejtek áramlási citometriás vizsgálata során az LTi sejtek (Lin⁻Thy1⁺CD4⁺ROR γ t⁺) és CD11c⁺ dendritikus sejtek

száma szignifikánsan magasabb, a CD19⁺ B-sejtek száma viszont alacsonyabb volt Nkx2-3^{-/-} és MAdCAM-1^{-/-} egerekben a vad típusú kontrollokhöz viszonyítva. (16. ábra) A B-sejtek száma MAdCAM-1^{-/-} egerekben volt a legalacsonyabb, ami megváltozott limfocita megoszlást és az Nkx2-3^{-/-} törzsben megfigyelteknél kifejezettebb ILF-érés gátlást eredményezett.

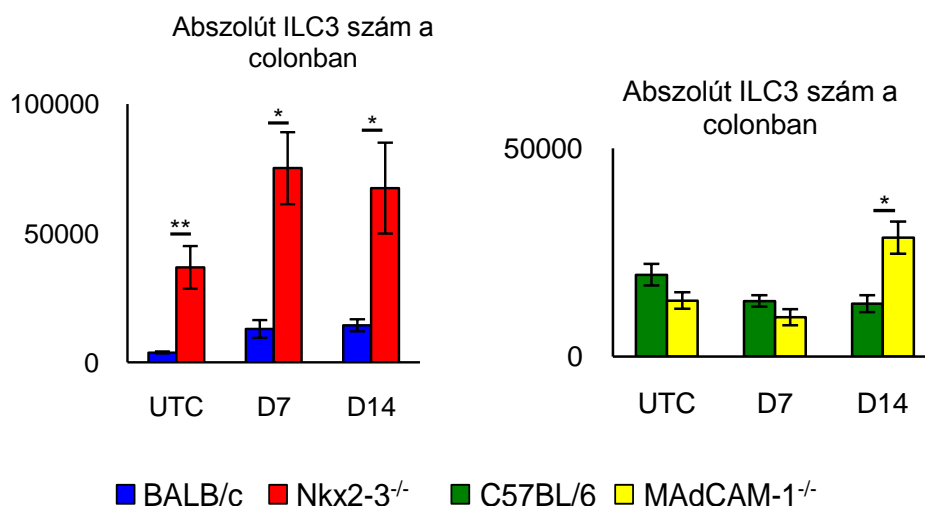


16. ábra. Megváltozott limfocita megoszlás Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányában.

LTi-, dendritikus- és B-sejtek abszolút száma a colonban, BALB/c, Nkx2-3^{-/-}, C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} egerekben. (n=3-16; átlag±SEM, *p < 0,05; **p < 0,005 ns: nem szignifikáns).

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

Nkx2-3 hiányában a RORγ⁺ 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 sejteken belül a CCR6⁺RORγ⁺CD3⁻ sejtek szignifikánsan magasabb számban, a CCR6⁻RORγ⁺CD3⁻ sejtek viszont alacsonyabb arányban voltak jelen Nkx2-3 hiányában. 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 DSS kezelés hatására a MAdCAM-1^{-/-} egerekben emelkedett az ILC3 sejtek aránya, a 14. nappal pedig szignifikánsan magasabb lett a számuk a vad típusú C57BL/6 kontrollokban mértékhez képest. (17. ábra)



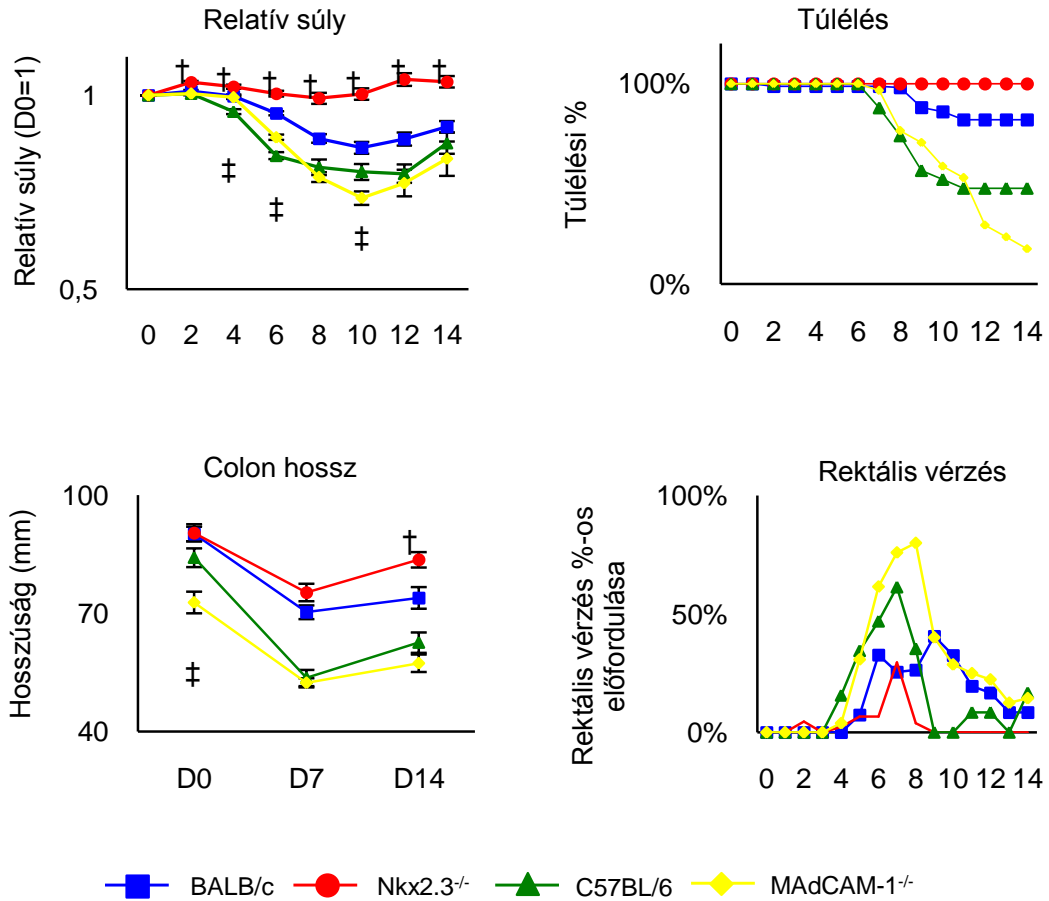
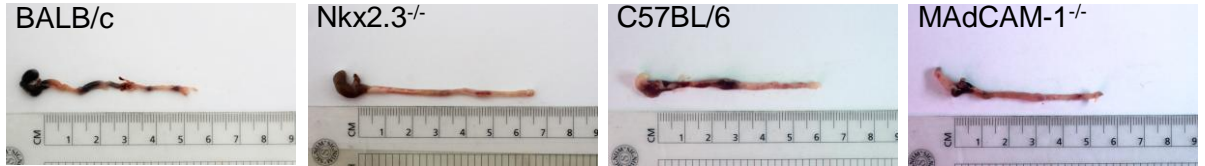
17. ábra. Eltérő lamina propria ILC3 megoszlás a colonban Nkx2-3^{-/-} és MAdCAM-1^{-/-} egerekben.

Abszolút ILC3 szám a colonban, BALB/c és Nkx2-3^{-/-}, valamint C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} egerekben; (n=3-9 egér/genotípus/csoport; átlag±SEM, *p <0,05; **p <0,005; UTC=kezeletlen kontroll, D7=DSS kezelés 7. napja, D14=DSS kezelés 14. napja).

4.8 Nkx2-3 hiányos egerek védettek a DSS indukálta colitisszel szemben

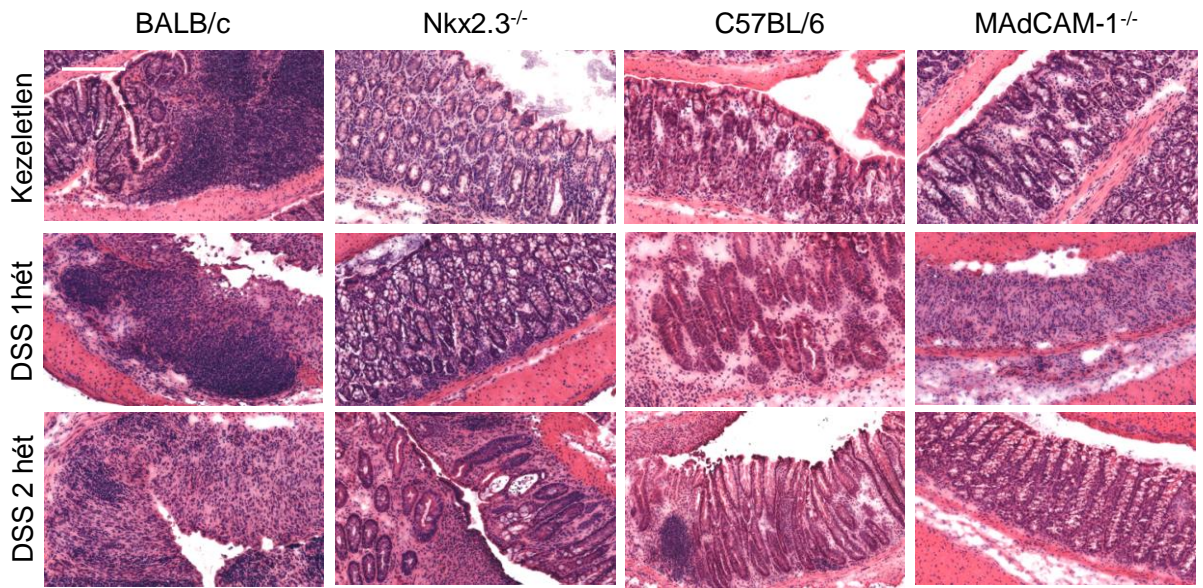
Korábbi megfigyelések alapján a colitis kialakulása előidézhetheti a CP-ok matILF-é érését, (94, 95) ezért DSS-indukálta colitis egérmódelben is vizsgáltuk a SILT megoszlást a colonban. Az egereket 7 napig itattuk 2,5% DSS tartalmú vízzel, majd a 7. (akut colitis) és a 14. (szubakut colitis) napon vizsgáltuk 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 Nkx2-3^{-/-} egereknél a DSS kezelés alatt így csak minimális súlycsökkenést figyeltünk meg, rektális vézést is csak néhány egyednél tapasztaltunk, emellett a colon rövidülése minimális, a túlélési arány pedig 100%-os volt. (18. ábra) A hematoxin-eozin festett colon metszetek szövettani kiértékelése során Nkx2-3 hiányában alacsonyabb patológiai érték volt megállapítható 7 és 14 nappal a kezelés kezdetét követően, mint vad típusú (BALB/c) társaik esetében. (19. ábra)

Annak vizsgálatára, hogy Nkx2-3^{-/-} egerekben az endotél MAdCAM-1 hiánya okozza-e a DSS indukálta colitisszel szembeni védelmet, kísérleteink 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. (18-19. ábra)

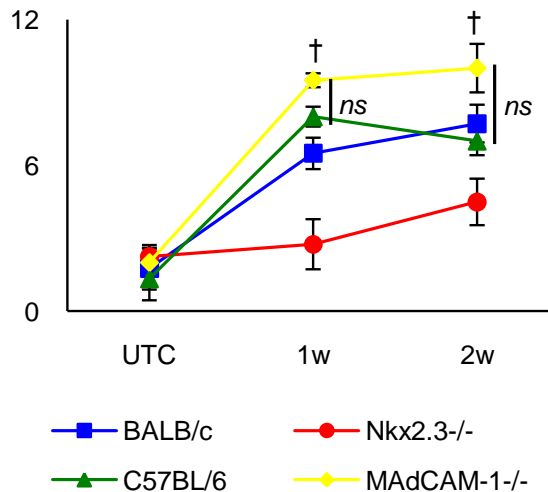


18. Ábra. Nkx2-3 hiányos egerek védettek a DSS indukálta colitisszel szemben.

Reprezentatív colon képek (fent), relatív súly (középen balra), túlélés (középen jobbra), colon hossz (lent balra), és makroszkópos rektális vérzés (lent jobbra) DSS-kezelt BALB/c, Nkx2-3^{-/-}, C57BL/6, és MAdCAM-1^{-/-} egerekben. (n>50 egér/genotípus, egy reprezentatív kép/genotípus); †= szignifikáns különbség BALB/c és Nkx2-3^{-/-}; ‡= szignifikáns különbség C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} között; D0=DSS kezelés 0. napja, D7=DSS kezelés 7. napja, D14=DSS kezelés 14. napja).



Hematoxin eozin érték



19. ábra. H&E festés és patológiai értékelés BALB/c, Nkx2-3^{-/-}, C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} egerek colonjában.

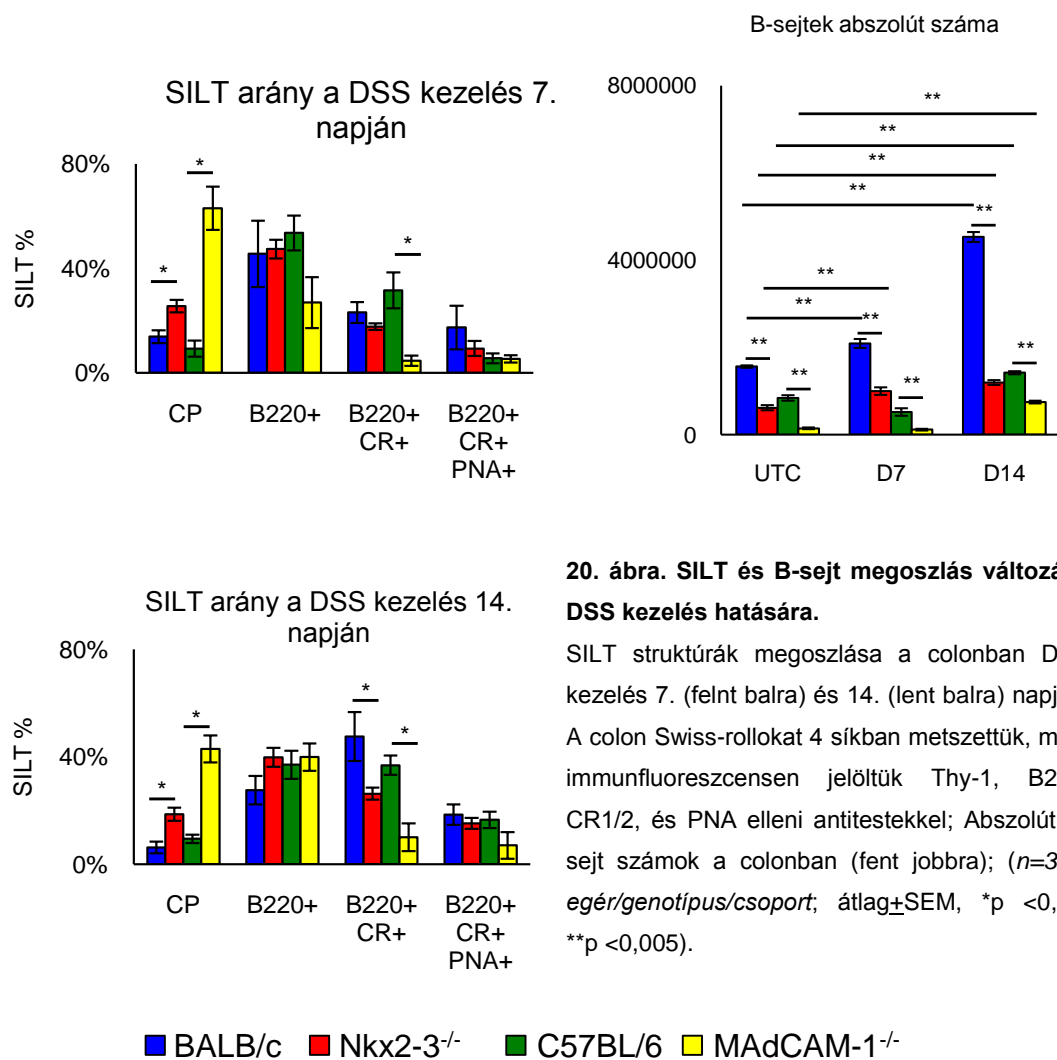
H&E festés reprezentatív képe; (n=5-9 egér/genotípus/csoport; scale bar = 250µm; átlag±SEM; †=szignifikáns különbség BALB/c és Nkx2-3^{-/-} között; ns=nem szignifikáns; UTC=kezeletlen kontroll, 1w=DSS kezelés 7. napja, 2w=DSS kezelés 14. napja).

Vad típusú kontroll egerekben DSS kezelés hatására emelkedett a CR2⁺ FDC-eket, valamint PNA⁺ csíracentrumokat tartalmazó SILT struktúrák száma, ezzel ellentétben Nkx2-3 hiányában késleltetett SILT érés volt megfigyelhető. A DSS kezelést követő első hétre az Nkx2-3^{-/-} egerekben alacsonyabb volt az érett SILT-ek aránya vad típusú társaikhoz képest, viszont a második héten már nem mutatkozott jelentős eltérés a két genotípus között. 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. (20. ábra)

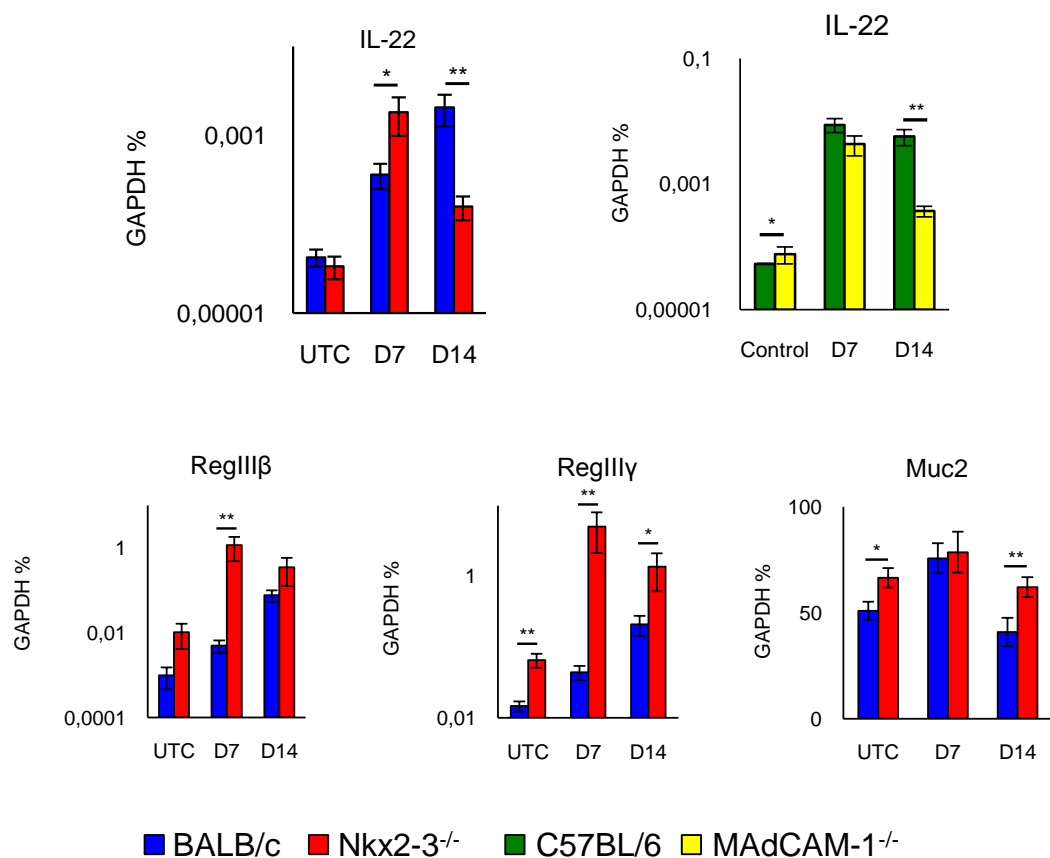
A B-sejtek számának eltérő kinetikájú növekedését áramlási citometriával is igazoltuk. Az Nkx2-3 és MAdCAM-1 deficiens egerek colonjában a kezelés teljes időtartama alatt alacsonyabb volt a B-sejtek száma, mint a kontrollokban. Nkx2-3^{-/-} egerek colonjában a kezelés 7. napjára, MAdCAM-1^{-/-} egerekben viszont csak a 14. napra emelkedett a B-sejtek száma. (20. ábra)

Nkx2-3^{-/-} és MAdCAM-1^{-/-} egerekben a MAdCAM-1 különböző típusú hiánya és az ennek következtében kialakult eltérő vaszkuláris adresszin expresszió a colon ereken magyarázatot adhat a késleltetett SILT érése; 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 bélgyulladásal szembeni védetség IL-22 független

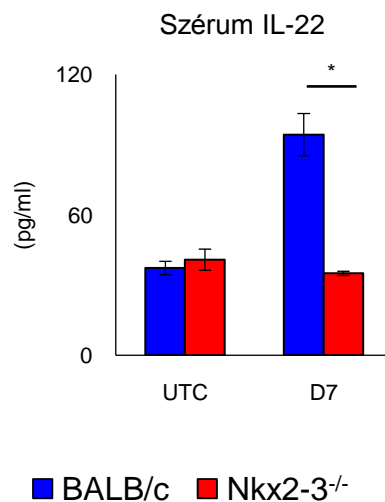
Korábbi kutatások során kimutatták, hogy az (ILC3 sejtek által is termelt) IL-22 képes indukálni a mukózális regenerációban fontos szerepet betöltő Reg fehérjék és mucinok termelését, ami így fontos szerepet játszhat a colitisszel szembeni védelemben. (96, 97) Kutatócsoportunk az IL-22, RegIII β és RegIII 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. (21. ábra)



21. ábra. IL-22 és az általa indukált protektív faktorok mRNS szintje.

IL-22 cDNS qPCR eredményei BALB/c és Nkx2-3^{-/-}, valamint C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} egerek disztális colonjaiból. (fent) RegIII β RegIII γ és Muc2 cDNS qPCR eredményei BALB/c és Nkx2-3^{-/-} disztális colonjaiból. (lent) ($n=5-10$ egér/genotípus/csoport). átlag \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. UTC=kezeletlen kontroll, D7=DSS kezelés 7. napja, D14=DSS kezelés 14. napja.

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 szérumszintjében nem találtunk eltérést, viszont a DSS kezelés során az IL-22 szérumszintje szignifikánsan alacsonyabb volt Nkx2-3 hiányában (**22. ábra**). 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.

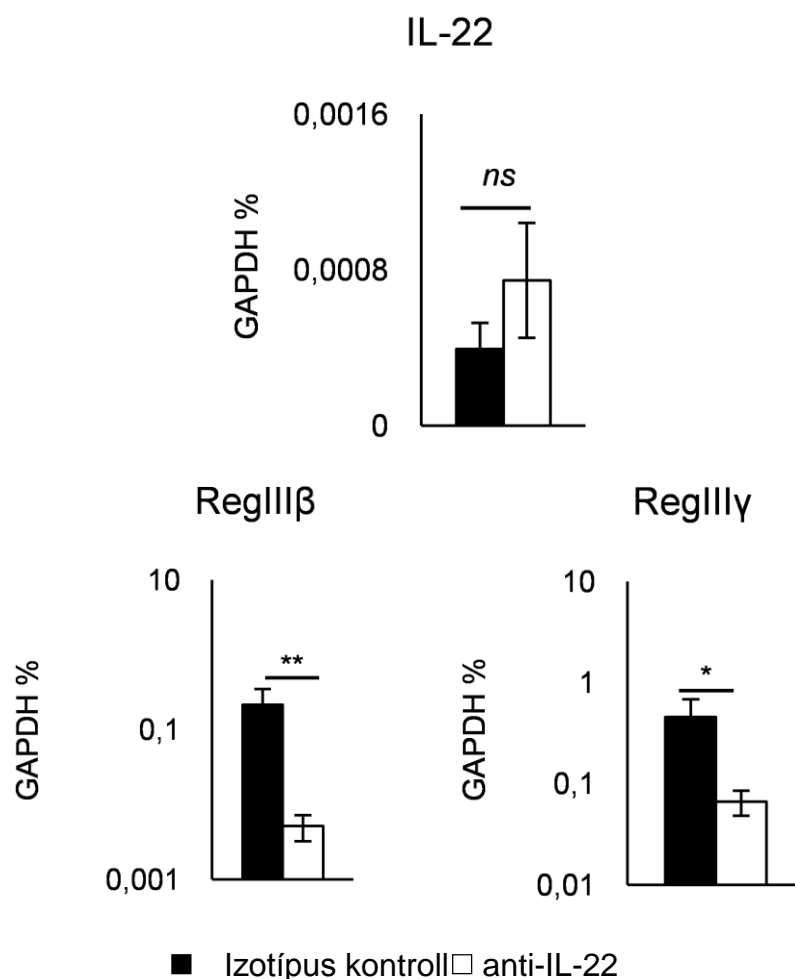


22. ábra. Nkx2-3 és BALB/c egerek szérumszintű IL-22 szintjeinek eltérése ELISA mérés alapján.

Nkx2-3 hiányában a szérumszintű IL-22 szint szignifikánsan csökken akut colitisben. ($n=5-10$ egér/genotípus/csoport; átlag \pm SEM, * $p<0.05$, ** $p<0.005$. UTC=kezeletlen kontroll, D7=DSS kezelés 7. napja)

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 a kezelés hatására nem történt változás, 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. (**23. ábra**) 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.



23. ábra. Nkx2-3-hiányos egerek IL-22, RegIIIβ és RegIIIγ mRNS szintek változása anti-IL-22 kezelés után.

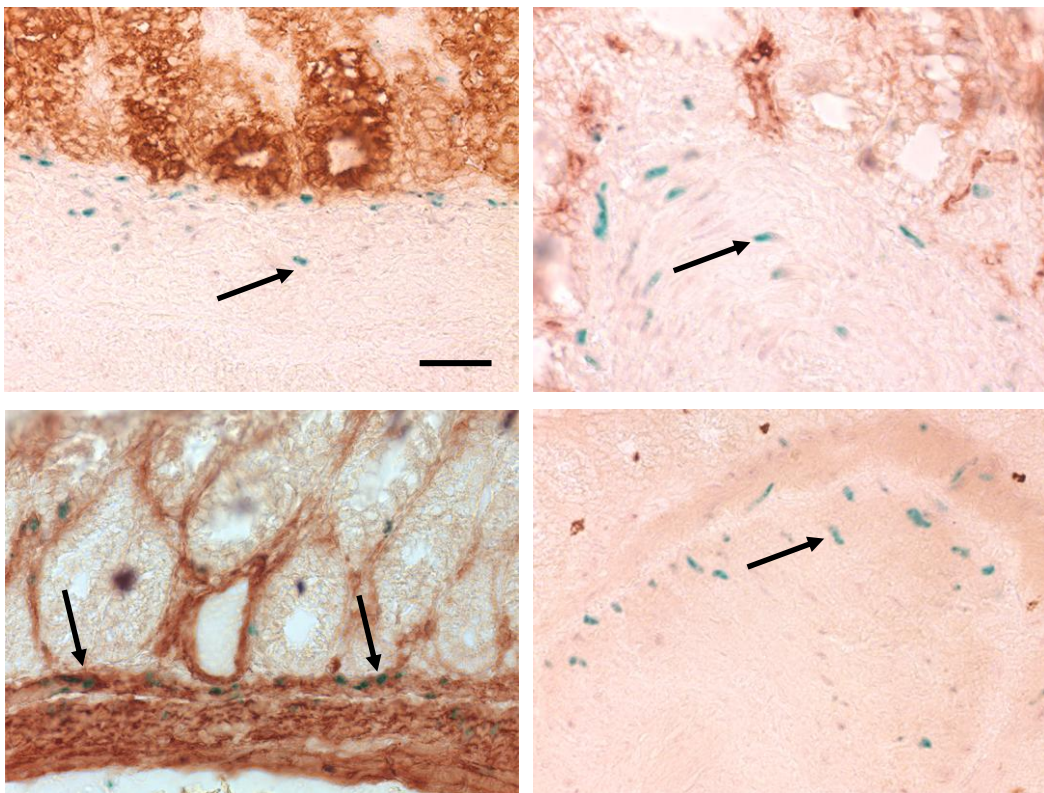
IL-22, RegIIIβ és RegIIIγ cDNS qPCR eredményei DSS kezelt Nkx2-3^{-/-} egerek disztális colonjaiból, anti-IL-22 vagy isotípus kontroll monoklonális antitest beadását követően; (n=12 egér/csoport; átlag±SEM, *p<0,05; **p<0,005; ns: nem szignifikáns).

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 sejtttranszplantáció 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 hematopoietikus, hanem a strómasejtek gátolják a colitis kialakulását.

Az Nkx2-3 fehérjét kifejező nem-hematopoetikus sejtek azonosítására LacZ-Nkx2-3^{+/-} riporter 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-musculáris-mukóza rétegében igen (**24. ábra**). Ez a megfigyelés összeegyeztethető a nemrég publikált humán eredményekkel is. (86)



24. ábra. Nkx2-3 kifejeződése egér colonban.

Reprezentatív immunhisztokémiai képek LacZ-Nkx2-3^{+/-} riporter egér colonjáról. anti-EpCAM (fent balra), IBL-20 (fent jobbra), anti-VAP-1 (lent balra) vagy izotípus kontroll (lent jobbra) antitestekkel jelölve ($n=5$ egér). A nyilak a LacZ⁺ sejtmagokat mutatják Nkx2-3 expresszáló sejtekben; (scale bar = 50 μ m).

5. Megbeszélés

Az IBD napjaink egyik leggyakrabban előforduló gyulladásos 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 gyulladásos bélbetegségek egyik jellemzője az ektopiás nyirokszöveti neogenezis, melyben az ILC3 sejtek szintén fontos szerepet töltenek be. (98, 99, 100). Ezekben a folyamatokban az ILC3 sejtek citokin-termelésük és más sejtekkel való interakciójuk révén vesznek részt.

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 $\alpha 4\beta 7$ 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 jelenik meg, a nem-endotél MAdCAM-1 expresszió (pl. FDC felszínen) viszont megtartott. Ezek alapján tehát az Nkx2-3 faktor hatása korlátozottnak bizonyul. (47, 101) Az Nkx2-3 deficiens egerekkel szemben a MAdCAM-1^{-/-} egereket általános MAdCAM-1 hiány (87), valamint emelkedett PNA 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. Egyhetes 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. Ebben a korban Nkx2-3^{-/-} és vad típusú egerek pLN-jében is a MAdCAM-1 az uralkodó adresszin.(83)

A BALB/c alapú Nkx2-3^{-/-} és heterozigóta, valamint a C57BL/6 alapú MAdCAM-1^{-/-} és vad típusú törzsek között jelentős eltéréseket figyeltünk meg az ILC3 sejtek megoszlásában. Ez a különbség valószínűleg a C57BL/6 típusú egereknél korábban már leírt vékonybél ILF-ek késleltetett érésének köszönhető. (93) 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. Az első posztnatális héten a colonban sokkal alacsonyabb abszolút ILC3 számokat figyeltünk meg minden vizsgált egértörzsben. A második hétre az ILC3 szám jelentősen emelkedett Nkx2-3^{-/-} és heterozigóta, viszont tovább csökkent C57BL/6 és MAdCAM-1^{-/-} egerekben. A negyedik hétre a MAdCAM-1^{-/-} törzsben szinte nullára csökkent az ILC3 sejtek száma a colonban, ellentétben a vékonybéllel, ahol nem tapasztaltunk ilyen szignifikáns csökkenést az abszolút ILC3 számban. Ennek az lehet az oka, hogy a vékonybélben eltérő faktorok biztosítják az ILF-ek kialakulását, valamint egy alternatív adresszin részlegesen is kompenzálhatja a MAdCAM-1 hiányát. (102)

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 negyedik héten a C57BL/6 egerek colonjában alacsonyabb matILF arányt tapasztaltunk, valamint a stabil CP arányhoz képest alacsonyabb imILF arányt figyeltünk meg. Ebből arra következtettünk, hogy a CP kialakuláshoz képest az imILF-é majd matILF-é érés folyamata a vékonybélben korábban leírtakhoz hasonlóan a colonban is késleltetett. (103) 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. (104) Ezzel szemben MAdCAM-1 hiányában az ILF további érése nagymértékben gátolt. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy MAdCAM-1 hiányában a PNAd adresszin emelkedett expressziója sem képes a MAdCAM-1 szerepét pótolni, az Nkx2-3^{-/-} egerekben pedig a részlegesen megtartott MAdCAM-1 expresszió miatt kevésbé súlyos az ILF érés gátlása.

Munkánk során vizsgáltuk a különböző MAdCAM-1 hiányok immunválaszra gyakorolt hatását is, mivel az $\alpha\beta 7$ integrin – MAdCAM-1 kölcsönhatás nem csak a PP-

ok, hanem a perifériás nyirokcsomók kialakulásában is szerepet játszik embrionális korban. (47) 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 sejtek nyirokcsomó előtelepbe vándorlása embrionális korban a MAdCAM-1 teljes hiányában is az endotél adresszin profil plaszticitását mutatja. Ez a plaszticitás megkérdőjelezi az anti-adhézión terápiai 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 gyulladási 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 védettség colitisszel szemben. A gyulladásgátlásért felelős sejtek azonosítására és vizsgálatára gyulladás-indukción átment BALB/c egerek és Nkx2-3 egerek közötti reciprok mukózális leukocita-transzfer kísérletek nyújthatnak jövőbeni vizsgálati lehetőséget.

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 géniütött egértörzs között. Nkx2-3^{-/-} egerekben a Glycam1 szintje szignifikánsan magasabb volt (83), ezzel szemben MAdCAM-1^{-/-} egerekben a Glycam1 expresszió változatlan, a podocalyxin-like protein, endomucin és

CD34 expressziós szintje viszont magasabb volt a vad típusban mértékhez képest. A szulfotranszferáz enzim (Chst4) szint mindkét törzsben magasabb volt a releváns kontrollokhöz hasonlítva. Ezek az eredmények tehát azt mutatják, hogy a két különböző fokú MAdCAM-1 hiányban szenvedő egértörzsben a PNA_d expressziós szintjének növekedése általi kompenzáció, különböző mRNS expressziós mintázat révén valósul meg. Ez a megváltozott PNA_d 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 (101) megegyezően azt figyeltük meg, hogy a CP-ok és imILF-ek megjelenése független a MAdCAM-1/ α 4 β 7 kölcsönhatástól. Kérdéses azonban, hogy az Nkx2-3^{-/-} PP-okban a kutatócsoportunk által korábban megfigyeltékhez hasonlóan a MAdCAM-1/ α 4 β 7 függő homing mechanizmus L-selectin/PNA_d váltása valósul-e meg MAdCAM-1^{-/-} egerekben is. (83) 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. (103) Ennek ellenére Nkx2-3^{-/-} egerben 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. (104)

A DSS kezelés hatását csontvelő kimerákon 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) ismételt próbálkozásaink ellenére is 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 összetevők 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 mikrokozmoszt, 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 egérben is a lamina propria alatti izomrétegben expresszálódik, (91) 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. (105, 106) A kérdés tisztázására az Nkx2-3 sejtvonal-specifikus 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 gyulladáshoz vezető 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 PNA_d 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 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 adresszintől 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-musculáris-mukóza rétegében található VAP-1⁺ miofibroblasztokban.

7. Publikációk, előadások 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; 22:421–430.

IF: 1,935

Az értekezéshez kapcsolódó kongresszusi előadások

A Magyar Immunológiai Társaság 44. Vándorgyűlése, Velence. 2015.10.14-16.
Homeodomain transcription factor Nkx2-3 influences the distribution of intestinal innate lymphoid cell type 3 (ILC3) subsets under normal and inflammatory conditions in a region-dependent manner.

3rd Meeting of Middle - European Societies for Immunology and Allergology Budapest, Hungary. 2016.12.1-3.

Homeodomain transcription factor Nkx2-3 influences the distribution of intestinal innate lymphoid cell type 3 (ILC3) under normal and inflammatory conditions in a region-dependent manner.

A Magyar Immunológiai Társaság 46. Vándorgyűlése, Velence. 2017.10.18-20.

MAdCAM-1 independent distribution of intestinal innate lymphoid cell type 3 (ILC3) in the absence of Nkx2-3.

A Magyar Immunológiai Társaság 47. Vándorgyűlése, Velence 2018.10.17-19.
Differential effects of the absence of Nkx2-3 and MAdCAM-1 on the distribution of intestinal ILC3 cells and postnatal SILT formation in mice.

8. Irodalomjegyzék

1. Loftus Jr EV, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002;31:1–20.
2. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, et al. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008; 40:710–2.
3. Cho JH, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2007; 133:1327–39.
4. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2009.11.19; 361(21): 2066–2078.
5. Verstockt B, Smith KG, Lee JC. Genome-wide association studies in Crohn's disease: past, present and future. *Clin Transl Immunol.* 2018;7:e1001.
6. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet.* 2015;47:979-986.
7. Zhang Y, Tian L, Sleiman P, Ghosh S, Hakonarson H, International IBD Genetics Consortium. Bayesian analysis of genome-wide inflammatory bowel disease data sets reveals new risk loci. *Eur J Hum Genet.* 2018;26:265-274.
8. Abraham C, Cho JH. Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflamm Bowel Dis.* 2006; 12:641–50.
9. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23r as an inflammatory bowel disease gene. *Science.* 2006; 314:1461–3.

10. Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003; 52:65–70.
11. Mangan PR, Harrington LE, O’Quinn DB, et al. Transforming growth factor beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006; 441:231–4.
12. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, et al. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet*. 2007; 3(4):e58.
13. Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostanoid receptors and acute inflammation in skin. *Biochimie*. 2014;08.107Pt A: 78–81.
14. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn’s disease. *Nat Genet*. 2008; 40:955–62.
15. Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. 2008; 134:743-56.
16. Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, et al. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet*. 2008; 4(4):e1000024.
17. de Lange KM, Moutsianas L, Lee JC, et al. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2017; 49:256-261.
18. Parkes, M, Barrett JC, Prescott NJ, et al. Wellcome Trust Case Control Consortium. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn’s disease susceptibility. *Nat. Genet*. 2007;. 39: 830–832.
19. Fisher, SA, Tremelling M, Anderson CA, et al. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn’s disease. *Nat. Genet*. 2008; 40: 710–712.

20. Yu, W, Hegarty JP, Berg A, et al. PTPN2 is associated with Crohn's disease and its expression is regulated by NKX2-3. *Dis. Markers*. 2012; 32: 83–91.
21. Yu W, Hegarty JP, Berg A, et al. NKX2-3 transcriptional regulation of endothelin-1 and VEGF signaling in human intestinal microvascular endothelial cells. *PLoS One*. 2011; 6: e20454.
22. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis*. 2007; 44:256– 62.
23. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005; 307:1915–20.
24. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*. 2005; 206:260–76.
25. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*. 2007; 117:1566–74.
26. Wang F, Schwarz BT, Graham WV, et al. IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology*. 2006; 131:1153–63.
27. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:18129–34.
28. Makita S, Kanai T, Oshima S, et al. CD4⁺CD25^{bright} T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol*. 2004; 173:3119–30.
29. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:767–77.

30. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet.* 2008; 40:1319–23.
31. Velázquez P, Wei B, Braun J. Surveillance B lymphocytes and mucosal immunoregulation. *Springer Semin Immunopathol.* 2005; 26:453–62.
32. Niess JH, Brand S, Gu X, et al. CX3-CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science.* 2005; 307:254–8.
33. Hatoum OA, Heidemann J, Binion DG. The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1072:78–97.
34. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY. Retinoic acid imprints gut homing specificity on T cells. *Immunity.* 2004; 21:527–38.
35. Pabst O, Forster R, Lipp M, Engel H, Arnold HH. NKX2-3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen and mucosa associated lymphoid tissue. *EMBO J.* 2000;19:2015–2023.
36. Bamias G, Kristen O, Arseneau B, Cominelli F. Mouse models of inflammatory bowel disease for investigating mucosal immunity in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol.* 2017; 33:411–416
37. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat Proto.* 2017; 12:1295–1309.
38. Pizarro TT, Pastorelli L, Bamias G, et al. SAMP1/YitFc mouse strain: a spontaneous model of Crohn’s disease-like ileitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17:2566–2584.
39. Bamias G, Dahman MI, Arseneau KO, et al. Intestinal-specific TNF alpha overexpression induces Crohn’s-like ileitis in mice. *PLoS One.* 2013; 8:e72594.

40. Cupedo T, Vondenhoff MFR, Heeregrave EJ, et al. Presumptive lymph node organizers are differentially represented in developing mesenteric and peripheral nodes *J Immunol* 2004; September 1, 173 (5) 2968-2975.
41. Yokoto Y, Mansouri A, Mori S, et al. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature*. 1999; 397:702–6.
42. Sun Z, Unutmaz D, Zou YR, et al. Requirement for ROR γ in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science*. 2000; 288:2369–73.
43. Wilting J, Papoutsi M, Christ B, et al. The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. *Faseb J*. 2002; 16:1271–3.
44. Okuda M, Togawa A, Wada H, Nishikawa S. Distinct activities of stromal cells involved in the organogenesis of lymph nodes and Peyer's patches. *J Immunol*. 2007; 179:804–11.
45. Koni PA, Sacca R, Lawton P, et al. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins α and β revealed in lymphotoxin β deficient mice. *Immunity*. 1997; 6:491–500.
46. Honda K, Nakano H, Yoshida H, et al. Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J Exp Med*. 2001; 193(5):621-30.
47. Mebius RE, Streeter PR, Michie S, Butcher EC, Weissman IL. A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4⁺ CD3⁻ cells to colonize lymph nodes. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 1996;93:11019–11024.

48. Yoshida H, Honda K, Shinkura R, et al. IL-7R α ⁺CD3⁻ cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches. *Int Immunol*. 1999; 11:643–55.
49. Veiga-Fernandes H, Coles MC, Foster KE, et al. Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's patch organogenesis. *Nature*. 2007; 446:547–51.
50. Finke D, Acha-Orbea H, Mattis A, et al. CD4⁺CD3⁻ cells induce Peyer's patch development: role of alpha4beta1 integrin activation by CXCR5. *Immunity* 2002; 17:363–73.
51. Hashi H, Yoshida H, Honda K, et al. Compartmentalization of Peyer's patch anlagen before lymphocyte entry. *J Immunol*. 2001; 166:3702–9.
52. Baptista AP, Olivier PJ, Goverse G, et al. Colonic patch and colonic SILT development are independent and differentially regulated events. *Mucosal Immunol*. 2013; 05.6(3):511-21.
53. Lügering A, Ross M, Sieker M, et al. CCR6 identifies lymphoid tissue inducer cells within cryptopatches. *Clin Exp Immunol*. 2010 Jun; 160 (3):440-9.
54. Ebihara T, Song C, Ryu SH, et al. Runx3 specifies lineage commitment of innate lymphoid cells. *Nat Immunol*. 2015; 16:1124–1133.
55. Li S, Heller JJ, Bostick JW, et al. Ikaros inhibits group 3 innate lymphoid cell development and function by suppressing the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Immunity*. 2016; Jul 19; 45 (1):185-97.
56. Lee JS, Cella M, McDonald KG, et al. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nat Immunol*. 2011; 13:144–151

57. Velaga S, Herbrand H, Friedrichsen H, et al. Chemokine receptor CXCR5 supports solitary intestinal lymphoid tissue formation, B cell homing, and induction of intestinal IgA responses. *J. Immunol.* 2009; 182 , 2610 – 2619.
58. Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature.* 2008; 456, 507 – 510.
59. Pabst O, Herbrand H, Friedrichsen M, et al. Adaptation of solitary intestinal lymphoid tissue in response to microbiota and chemokine receptor CCR7 signaling. *J. Immunol.* 2006; 177 , 6824 – 6832.
60. Cherrier M, Sawa S, Eberl G. Notch, Id2, and ROR γ t sequentially orchestrate the fetal development of lymphoid tissue inducer cells, *J. Exp. Med.* 2012; 209 (4) 729–740.
61. Spits H, Cupedo T. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30:647–75.
62. Spits H, Bernink JH, Lanier L, NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense, *Nat. Immunol.* 2016; 17 (7) 758–764.
63. Kellermayer Z, Vojkovic D, Balogh P. Innate lymphoid cells and their stromal microenvironments. *Immunol Lett.* 2017; Sep; 189:3-9.
64. Tsuji M, Suzuki K, Kitamura H, et al. Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity.* 2008; 29 (2) 261–271.
65. Robinette ML, Fuchs A, Cortez VS, et al. Immunological Genome Consortium, Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat. Immunol.* 2015; 16 (13) 306–317.

66. Satoh-Takayama N, Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, et al. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46⁺ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity*. 2008; 29 (6) 958–970.
67. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.* 2011; 12:383–90.
68. Pearson C, Thornton EE, McKenzie B, et al. ILC3 GM-CSF production and mobilisation orchestrate acute intestinal inflammation. *Elife*. 2016; Jan 18; 5: e10066.
69. Stanfel MN, Moses KA, Schwartz RJ, Zimmer WE. Regulation of organ development by the NKX-homeodomain factors: an NKX code. *Cell Molec Bio* (Noisy-le-grand). 2005. Suppl 51: OL785–99.
70. Hayashi S, Scott MP. What determines the specificity of action of Drosophila homeodomain proteins? *Cell*. 1990;63:883–894.
71. Jagla K, Bellard M, Frasch M. A cluster of Drosophila homeobox genes involved in mesoderm differentiation programs. *Bioessays*. 2001;23:125–133.
72. Hombria JC, Lovegrove B. Beyond homeosis - HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation*. 2003;71:461–476.
73. Vojkovic 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.
74. Lettice LA, Purdie LA, Carlson GJ, Kilanowski F, Dorin J, Hill RE. The mouse bagpipe gene controls development of axial skeleton, skull, and spleen. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1999;96:9695–9700.

75. Pabst O, Zweigerdt R, Arnold HH. Targeted disruption of the homeobox transcription factor Nkx2-3 in mice results in postnatal lethality and abnormal development of small intestine and spleen. *Development*. 1999;126:2215–2225.
76. Pabst O, Schneider A, Brand T, Arnold HH. The mouse Nkx2-3 homeodomain gene is expressed in gut mesenchyme during pre- and postnatal mouse development. *Dev Dynamics*. 1997;209:29–35.
77. Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN. Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays*. 2007;29:166–177.
78. Balazs M, Horvath G, Grama L, Balogh P. Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. *Cell Immunol*. 2001;212:126–137.
79. Balogh P, Balazs M, Czompoly T, Weih DS, Arnold HH, Weih F. Distinct roles of lymphotoxin-beta signaling and the homeodomain transcription factor Nkx2-3 in the ontogeny of endothelial compartments in spleen. *Cell Tissue Res*. 2007;328:473–486.
80. Czompoly T, Labadi A, Kellermayer Z, Olasz K, Arnold HH, Balogh P. Transcription factor Nkx2-3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen. *J Immunol*. 2011;186:6981–6989.
81. Guo F, Weih D, Meier E, Weih F. Constitutive alternative NF-kappa B signaling promotes marginal zone B-cell development but disrupts the marginal sinus and induces HEV-like structures in the spleen. *Blood*. 2007;110:2381–2389.
82. Kellermayer Z, Labadi A, Czompoly T, Arnold HH, Balogh P. Absence of Nkx2-3 homeodomain transcription factor induces the formation of LYVE-1-positive endothelial cysts without lymphatic commitment in the spleen. *J Histochem Cytochem*. 2011;59:690–700.
83. Kellermayer Z, Mihalj M, Labadi A, Czömpöly T, Lee M, O’Hara E et al. Absence of Nkx2-3 homeodomain transcription factor reprograms the endothelial addressin

preference for lymphocyte homing in Peyer's patches. *J Immunol.* 2014;193:5284–5293.

84. Lee M, Kiefel H, La Jevic MD, Macauley MS, O'Hara E et al. Transcriptional programs for lymphoid tissue capillary and high endothelium reveal control mechanisms for lymphocyte homing. *Nat. Immunol.* 2014;15: 982–985.

85. Kellermayer Z, Hayasaka H, Kajtar B, et al. Divergence of vascular specification in visceral lymphoid organs - genetic determinants and differentiation checkpoints. *Int Rev Immunol.* 2016;35:489–502.

86. Hsia LT, Ashley N, Ouaret D, et al. Myofibroblasts are distinguished from activated skin fibroblasts by the expression of AOC3 and other associated markers. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 2016; 113:E2162–E2171.

87. Schippers A, Leuker C, Pabst O, et al. Mucosal addressin cell adhesion molecule-1 controls plasma-cell migration and function in the small intestine of mice. *Gastroenterology.* 2009; 137(3): 924-933.

88. Scotto L, Kruithof-de Julio M, Paoluzzi L, et al. Development and characterization of a novel CD19CherryLuciferase (CD19CL) transgenic mouse for the preclinical study of B-cell lymphomas. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18: 3803–3811.

89. Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, et al. RORgammat⁺ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat Immunol.* 2011; 12(4): 320-326.

90. Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martinez L, et al. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect. Immun.* 2003; 71: 2839–2858.

91. Wang CC, Biben C, Robb L, et al. Homeodomain factor Nkx2-3 controls regional expression of leukocyte homing coreceptor MAdCAM-1 in specialized endothelial cells of the viscera. *Dev Biol.* 2000 Aug 15; 224 (2):152-67.

92. Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol.* 2003; 92–303.
93. McDonald KG, McDonough JS, Dieckgraefe BK, Newberry RD. Dendritic cells produce CXCL13 and participate in the development of murine small intestine lymphoid tissues. *Am. J. Pathol.* 2010; 176: 2367–2377.
94. Lochner M, Ohnmacht C, Presley L, et al. Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of ROR γ t and LTi cells. *J. Exp. Med.* 2011; 208: 125–134.
95. Olivier BJ, Cailotto C, van der Vliet J, et al. Vagal innervation is required for the formation of tertiary lymphoid tissue in colitis. *Eur. J. Immunol.* 2016; 46: 2467–2480.
96. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* 2008; 14 : 282–289.
97. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* 2009; 206: 1465–1472.
98. Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV. Innate lymphoid cells in intestinal inflammation. *Front Immunol.* 2017; 8:1296.
99. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2004; 53:1–4.
100. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:458–66.
101. Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, et al. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol.* 2002; 168:57– 64.

102. Knoop KA, Butler BR, Kumar N, Newberry RD, Williams IR. Distinct developmental requirements for isolated lymphoid follicle formation in the small and large intestine: RANKL is essential only in the small intestine. *Am J Pathol.* 2011; 179:1861–71.
103. Ibiza S, García-Cassani B, Ribeiro H, et al. Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature.* 2016; 535: 440–443.
104. Garcia-Barcelo MM, Lau DK, Ngan ES, et al.. Evaluation of the thyroid transcription factor-1 gene (TTF1) as a Hirschsprung's disease locus. *Ann. Hum. Genet.* 2007; 71: 746–754.
105. Perochon J, Carroll LR, Cordero JB. Wnt signalling in intestinal cells: lessons from mice and flies. *Genes (Basel).* 2018; 9: 138.
106. Yu W, Lin J, Hegarty JP, et al. Genes regulated by Nkx2-3 in siRNA-mediated knockdown B cells: implication of endothelin-1 in inflammatory bowel disease. *Mol. Genet. Metab.* 2010; 100: 88–95.

9. 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 segítségéért.

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

10. Mellékletek

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.

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.

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.



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

Dóra Vojkovic^{1,2}, Zoltán Kellermayer^{1,2}, Fanni Gábris^{1,2}, Angela Schippers³, Norbert Wagner³, Gergely Berta⁴, Kornélia Farkas⁵ and Péter Balogh^{1,2*}

¹ Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs, Pécs, Hungary, ² Lymphoid Organogenesis Research Group, Szentágotai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary, ³ Department of Pediatrics, University Hospital RWTH, Aachen, Germany, ⁴ Central Electron Microscope Laboratory, Department of Medical Biology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁵ Department of Bioanalytics, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

OPEN ACCESS

Edited by:

Jessica Borger,
Monash University, Australia

Reviewed by:

Wenkai Ren,
South China Agricultural University,
China

Kamalakaran Rajasekaran,
Genentech, Inc., United States

*Correspondence:

Péter Balogh
balogh.peter@pte.hu

Specialty section:

This article was submitted to
NK and Innate Lymphoid Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 30 November 2018

Accepted: 13 February 2019

Published: 05 March 2019

Citation:

Vojkovic D, Kellermayer Z, Gábris F,
Schippers A, Wagner N, Berta G,
Farkas K and Balogh P (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.
doi: 10.3389/fimmu.2019.00366

Seeding of leukocytes to developing lymphoid tissues in embryonic and early postnatal age and to the mucosa throughout adulthood depends on the interaction between endothelial MAdCAM-1 addressin and its cognate ligand $\alpha 4\beta 7$ integrin. Nkx2-3 as a transcriptional regulator of MAdCAM-1 controls vascular patterning in visceral lymphoid tissues in mice, and has been identified as a susceptibility factor for inflammatory bowel diseases in humans, associated with lymphoid neogenesis in the inflamed intestines. The role of Nkx2-3 in the organogenesis of the solitary intestinal lymphoid tissues (SILTs) involving type 3 innate lymphoid cells (ILC3) is still unknown. Here we investigated the effect of Nkx2-3 on the postnatal distribution of intestinal ILC3s and the development of SILTs, comparing these to mice lacking MAdCAM-1, but preserving Nkx2-3. At 1 week of age small intestines (SI) contained significantly higher number of ILC3s relative to the colon, with a substantial reduction in MAdCAM-1^{-/-} mice compared to C57BL/6 controls. One week later SI ILC3 number decreased in all genotypes, the number of colonic ILC3 of both Nkx2-3-deficient and Nkx2-3-heterozygous mice significantly increased. On the fourth postnatal week a further reduction of SI ILC3s was observed in both Nkx2-3-deficient and Nkx2-3-heterozygous mice, while in the colon the number of ILC3s showed a significant reduction in all genotypes. At 1 week of age only sporadic SILT components were present in all genotypes. By the second week mice deficient for either Nkx2-3 or MAdCAM-1 showed absence of SILT maturation compared to their relevant controls, lacking mature isolated lymphoid follicles (ILF). By the fourth week both Nkx2-3-deficient and Nkx2-3-heterozygous mice showed a similar distribution of ILFs relative to cryptopatches (CP), whereas in MAdCAM-1^{-/-} mice CPs and immature ILFs were present, mature ILFs were scarce. Our data demonstrate that the complete absence of MAdCAM-1 partially impairs intestinal seeding of ILC3s and causes partial

blockade of SILT maturation, without affecting peripheral lymph node development. In contrast, the inactivation of *Nkx2-3* permits postnatal seeding, and its blocking effect on SILT maturation prevails at later stage, thus other adhesion molecules may compensate for the intestinal homing of ILC3s in the absence of MAdCAM-1.

Keywords: NKX2-3, MAdCAM-1, ILC3, isolated lymphoid follicle, cryptopatch

INTRODUCTION

The intestinal lymphoid tissues comprise a large and complex network with diverse developmental and structural features of its components. The development of programmed lymphoid tissues of the gut, such as the ileal Peyer's patches (PP) and colonic patches, is initiated during the embryonic period, forming separate T- and B-cell compartments, thus representing secondary lymphoid tissues. In contrast, cryptopatches (CP) and isolated lymphoid follicles (ILF) form postnatally and lack defined T-cell territories, representing an "instructed" form of secondary lymphoid tissues, influenced by environmental and dietary factors. Upon inflammatory conditions ILFs may further evolve into tertiary lymphoid tissues (1).

Despite their developmental and structural differences, PPs and CP/ILFs have common developmental requirements and cellular interactions. Critically, lymphoid tissue inducer (LTi) cells identified by *c-kit*, *IL-7R α* , *CD45*, and $\alpha 4\beta 7$ integrin and lack of mature T- and B-cell associated markers participate in the initiation of PP formation prenatally and colonic CP/ILF development in the postnatal period, similarly to their involvement in initiating embryonic lymph node formation (2). These cells are related to type 3 innate lymphoid cells (ILC3) expressing retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR γ t) (3, 4). Subsequent tissue-specific colonization of PP anlagen by circulating mature lymphocytes requires the recognition of MAdCAM-1 addressin displayed by mucosal high endothelial venules (HEVs) via $\alpha 4\beta 7$ integrin (5, 6). Similarly, ILF formation is initiated from pre-existing cryptopatches, where adult LTi-equivalent ILC3 cells are hypothesized to support the eventual transformation into follicles (7).

An important tissue-specific factor involved in the regulation of MAdCAM-1 addressin is *Nkx2-3* homeodomain transcription factor (8). *Nkx2-3*, a member of *Nkx* family, is expressed in the spleen, midgut, hindgut, and pharyngeal endoderm (9) and is necessary for the development of visceral mesoderm and later for the formation of several stromal cells of secondary lymphoid organs, including endothelial cells as well as intestinal and vascular smooth muscle cells (10). In mice the absence of *Nkx2-3* causes a lymph node-like switch of vascular patterning in spleen (11), characterized by the appearance of ectopic high endothelial venules (HEVs) expressing peripheral lymph node addressin (PNAd), and replacement of MAdCAM-1 with PNAd in PP HEVs in the early postnatal period (12). Consequently in mice lacking *Nkx2-3* PPs are smaller and less numerous (13). Interestingly, in the absence of *Nkx2-3* MAdCAM-1 expression is retained during embryogenesis, and disappears gradually from endothelial cells, but it still persists on follicular stromal cells (14). In humans *Nkx2-3* may contribute to the regulation of

colorectal stem cell niche through the maintenance of local myofibroblast identity (15). In genome-wide association studies (GWAS) single nucleotide polymorphisms of *Nkx2-3* have been linked to inflammatory bowel diseases, often associated with ectopic intestinal lymphoid tissue formation (16, 17).

Although *Nkx2-3* is crucial for the normal development of spleen and PP, its role in CP/ILF organogenesis is still unknown, including its effect on the intestinal distribution of ILC3s. As the postnatal SILT formation may recapitulate several events of secondary lymphoid organogenesis, we hypothesized that the lack of *Nkx2-3* as transcriptional regulator of MAdCAM-1, or the genomic absence of MAdCAM-1 itself as two different models for MAdCAM-1 deficiency, may influence the distribution of ILC3s and the postnatal formation of SILT. Our findings reveal considerably different kinetics for both CP/ILF formation and ILC3 distribution between small intestine and colon, indicating that different forms of MAdCAM-1 deficiency variably influence the development of distinct mucosal lymphoid tissues.

MATERIALS AND METHODS

Mice

MAdCAM-1^{-/-} (*Madcam1*^{tm1.2Nwag}) mice on C57BL/6J background (18) and *Nkx2.3*^{-/-} mice backcrossed onto BALB/cJ background (13) were maintained at the Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs. BALB/cJ and C57BL/6J mice were obtained from The Jacksons Laboratory, Bar Harbor, USA. In order to ensure comparable environmental conditions from birth, for *Nkx2-3* deficiency cage-matched *Nkx2-3* heterozygotes were used as control. Mice were kept in standard housing conditions prior to the experiments for at least 1 week. All procedures involving live animals were conducted in accordance with the guidelines set out by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of Pécs, Hungary, under license number BA02/2000-16/2015, with approval for the use of genetically modified organisms under license number SF/27-1/2014 issued by the Ministry of Rural Development, Hungary.

Antibodies and Reagents

For flow cytometry anti-Thy-1.2 (CD90.2)-PerCPCy5.5 (clone 53-2.1) was purchased from BioLegend, anti-CD3-FITC (clone KT3), anti-CD19-FITC (clone 1D3), and biotinylated anti-CD45 (clone IBL-3/16) were produced and labeled in our lab, the latter visualized with Streptavidin PE-Cy7 (Biolegend). Anti-PNAd mAb (clone MECA-79) was purchased from BD Biosciences, FITC-conjugated goat anti-rat IgG was purchased from Vector Laboratories. Anti-ROR γ t mAb (clone Q31-378) conjugated

with AlexaFluor647 and membrane permeabilization buffer were purchased from BD Biosciences. For tissue immunofluorescence the following rat mAbs were produced in our lab: anti-CD45 mAb (clone IBL-3/16) conjugated with FITC, anti-B220 mAb (clone RA3-6B2) labeled with CF647, anti-Thy-1 mAb (clone IBL-1) conjugated with TAMRA, anti-MAdCAM-1 (clone MECA-367) IgG purified from hybridoma supernatant using Protein G chromatography. The architecture of peripheral lymph nodes was determined using a cocktail of anti-CD21/35-FITC (clone 7G6, produced in our lab), anti-Thy-1-TAMRA, and anti-B220-CF647. For ELISA horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-mouse polyclonal antibody (Dako) was used.

Flow Cytometry

Lamina propria lymphocytes were isolated by a modification of a previously described protocol (19). Briefly, intestinal parts were cut open longitudinally and the PPs were cut out from the small intestine. In case of 1 and 2 week old mice at least 3 intestines were pooled. Colons and small intestines were washed in PBS and then shaken for 10–20 min in DMEM containing 10 mM EDTA (Sigma Aldrich) to remove the epithelial layer. Intestinal parts were washed thoroughly in ice cold PBS, cut into 3–5 mm pieces, and digested at 37°C in DMEM containing 0.6 mg/ml Collagenase D (Sigma Aldrich) and 5 U/ml DNase I (Sigma Aldrich). After 20 min the supernatant was collected by passing through 70 µm cell strainer (Greiner Bio-One), to the remaining tissue fragments freshly digesting medium was added and further incubated until completely dissociated. Mononuclear cells were separated with density gradient centrifugation using discontinuous 40%/80% (w/v) Percoll (Sigma Aldrich). The separated cells were washed in PBS, and labeled for flow cytometry first with a cocktail of mAbs against surface markers, followed by permeabilization and staining for RORγt. Measurements were carried out on a BD FACS Canto II flow cytometer. Within the lymphoid gate, at least five thousand CD45+CD3-CD19- cells were collected and analyzed using the FCS Express Software. ILC3 cells were determined as CD45+CD3-CD19-CD90/Thy1+RORγt+ cells.

Histology

For analyzing SILT composition 8 µm cryostat sections were cut at 4–6 different planes 100–150 µm apart from Swiss rolls prepared from small intestines and colons of 1, 2, and 4 week old mice. SILT structures were defined according to size, morphology, and cellular composition as follows: CP were Thy-1+/+/B220-, immature ILFs were Thy-1+/+/B220+, and mature ILF were defined as Thy-1±/B220++. For immunofluorescence labeling frozen sections were fixed in cold acetone for 10 min and then blocked in 5% BSA in PBS for 20 min. Multiple fluorescence labeling was performed by incubating the sections with a cocktail of fluorochrome-labeled mAbs against CD45, Thy-1, and B220 in PBS for 45 min followed by washing. For intestinal addressin expression frozen sections were incubated first with 5 µg/ml anti-MAdCAM-1 IgG in PBS, followed by washing and detection using FITC-conjugated anti-rat IgG (BD Biosciences). After saturation with 50x diluted normal rat serum sections were incubated with DyLight594-conjugated MECA-79 anti-mouse PNAd antibody (kindly provided by Eugene

C. Butcher, Stanford University) and anti-mouse CD45-CF647 conjugate. For peripheral lymph node analysis sections prepared at median plane inguinal lymph nodes were incubated with a cocktail of FITC anti-CD21/35 to detect follicular dendritic cells, TAMRA anti-Thy-1 against T cells and CF-647-conjugated anti-B220 mAb against B cells. After mounting with 1:1 PBS:glycerol, sections were viewed with an Olympus BX61 fluorescence microscope, and representative images were created with an Olympus Fluo-View FV-1000 laser scanning confocal imaging system. For single color labeling of MAdCAM-1 or PNAd acetone-fixed cryostat sections of small intestine or colon were incubated with anti-MAdCAM-1 or anti-PNAd mAb at 1 µg/ml antibody followed by FITC-conjugated anti-rat IgG (Vector Laboratories), using Hoechst 33,342 nuclear counterstaining in the mounting. The labeling intensities were quantified using Image J software.

Immunization and ELISA

To induce an anti-ovalbumin immune response, mice were immunized with 50 µl of 50 mg/ml OVA with complete Freund's adjuvant in the left footpads on day 0 and day 7. Mice were sacrificed on day 21 and serum was collected. To determine the anti-OVA IgG response, ELISA plates (Nunc Maxisorp, Thermo Scientific) were coated with 5 µg/ml ovalbumin (Sigma-Aldrich, Budapest) overnight in PBS, followed by saturation with 0.1% gelatine in PBA-0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) for 1 h at 37°C. After saturation and washing in PBS-Tween diluted sera of mice were added to blocked plates, followed by washing. Next, horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-mouse polyclonal antibody was added, and after incubation peroxidase activity was detected using ortho-phenylenediamine and H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) in citrate-phosphate buffer, pH: 5.0. The reaction was stopped with 4 M H₂SO₄. Samples were measured at 492 nm in duplicates.

Quantitative RT-PCR

Total RNA from inguinal lymph node, mesenteric lymph node and Peyer's patch homogenates was isolated using NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel GmbH). Purity and concentration of RNA was analyzed by NanoDrop. cDNA was synthesized using High Capacity cDNA RT Kit (Life Technologies). RT-PCR was run on an ABI-PRISM 7,500 machine in duplicates using previously described SYBR green primers (11). Results are shown as percentage of β-actin housekeeping gene.

Statistical Analysis

Data was analyzed using IBM[®] SPSS[®] Statistics software (Version 22). A Mann-Whitney test was applied to compare groups with non-normally distributed data. Data are represented as mean ± SEM. Statistical significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Postnatal Distribution of Intestinal ILC3 Is Perturbed in the Absence of Nkx2-3 and MAdCAM-1

Although the absence of Nkx2-3 causes transcriptional blockade of MAdCAM-1 expression (8, 14), our previous studies indicated

that the distribution of colonic lamina propria ILC3s in young adult mice are differentially affected in the lack of *Nkx2-3* compared to the absence of MAdCAM-1 itself, so in *Nkx2-3^{-/-}* mice the colonic ILC3 number was higher, whereas in MAdCAM-1^{-/-} mice ILC3 numbers were significantly less (20). In this work first we sought to determine how these two different forms of MAdCAM-1 deficiency affect the postnatal population kinetics of ILC3s along the entire intestinal tract. ILC3s isolated from the lamina propria at various postnatal ages were identified using flow cytometry as CD45+CD3-CD19-CD90+RORγt+ cells (Figure 1A).

Using this strategy a systemic analysis of postnatal colonization of ILC3 cells in the small intestine and colon was performed. The number of ILC3s in the small intestine (siILC3) was higher than colonic ILC3s (cILC3s) in all mouse strains at each time points. On the first postnatal week siILC3s were present at the highest number, and in the absence of *Nkx2-3* there were no significant alterations compared to control *Nkx2-3* heterozygous mice. In MAdCAM-1^{-/-} small intestines a considerably lower number of siILC3s was found compared to C57BL/6 controls; however, this decrease did not reach statistical significance.

On the second postnatal week siILC3 numbers substantially decreased in all mouse strains. We found that siILC3 numbers were the highest in mice lacking *Nkx2-3*, while lowest in MAdCAM-1^{-/-} mice.

By the fourth postnatal week siILC3s decreased significantly in each mouse strain except C57BL/6 mice, where a slight increase in ILC3 number was observed compared to the second week. In *Nkx2-3^{-/-}* mice the siILC3 number was significantly lower than in heterozygous controls. In MAdCAM-1^{-/-} mice siILC3 numbers were the lowest at each investigated time points, and both cILC3 and siILC3s decreased continuously until the fourth postnatal week.

At the first postnatal week both *Nkx2-3^{+/-}* and C57BL/6 wild-type mouse strains and *Nkx2-3* mutants showed a similar range of absolute numbers of cILC3s, while in MAdCAM-1^{-/-} mice the cILC3 numbers showed an approximately three-fold reduction at this time point.

On the second postnatal week, cILC3 numbers showed an around four-fold increase in both *Nkx2-3^{+/-}* and *Nkx2-3^{-/-}* mice. In contrast, cILC3 numbers in the absence of MAdCAM-1 further decreased, similarly to that in C57BL/6 control group.

By the fourth postnatal week in both *Nkx2-3^{+/-}* and *Nkx2-3^{-/-}* mice the number of cILC3 dropped considerably, although the absolute cILC3 numbers were still higher than on the first postnatal week. In contrast to the small intestine, where siILC3 number was significantly lower in the absence of *Nkx2-3*, in the colon of *Nkx2-3*-deficient mice the ILC3 cell number was higher. In contrast, in MAdCAM-1^{-/-} mice cILC3 absolute numbers decreased to an almost undetectable level, while in the control C57BL/6 group cILC3 numbers were similar to that on the first week (Figure 1C).

These data indicate that the different forms of MAdCAM-1-deficiency variably affect the postnatal distribution pattern of ILC3s along the intestinal tract, with a generalized absence of MAdCAM-1 in MAdCAM-1^{-/-} mice causing the most severe alterations.

Altered SILT Maturation in the Absence of *Nkx2-3* and MAdCAM-1

Our earlier studies showed that in the absence of *Nkx2-3* the perturbed lymphocyte distribution is coupled with an altered vascular pattern in PPs of young adult mice, including the gradual replacement of MAdCAM-1 by PNA^d (12). To test how this altered addressin pattern affects the development of SILT, next we compared the various differentiation stages of the SILT spectrum between mice lacking either *Nkx2-3* or MAdCAM-1 and wild-type controls during the first 4 weeks of postnatal period. As controls for *Nkx2-3^{-/-}* mice we used heterozygous littermates in order to maintain identical environmental conditions. SILT structures were identified with multiple immunofluorescence staining of colonic sections as described in the Materials and Methods. Immature and mature ILFs were distinguished also according to their morphology, as mature ILFs (matILF) are larger and often contain B220+ germinal centers while immature ILFs (imILFs) are smaller with less B220+ cells, and also with a less compacted organization (Figure 2A). The statistical analyses of the SILT maturation in different genotypes at various ages and in different gut segments are summarized on Figures 2B,C.

On the first postnatal week only CPs and imILFs were present in the colon of each mouse strain and no matILFs were found. The distribution of these immature SILT structures in *Nkx2-3^{-/-}* and MAdCAM-1^{-/-} mice were similar to their relevant *Nkx2-3^{+/-}* and C57BL/6 control groups. Interestingly the ratio of CP was higher in C57BL/6 and MAdCAM-1^{-/-} mice and these strains had less imILFs than either *Nkx2-3^{+/-}* or *Nkx2-3^{-/-}* mice.

On the second postnatal week matILFs also started to appear in *Nkx2-3* heterozygous mice, while in the *Nkx2-3^{-/-}* group matILFs were present only at a very low ratio. In MAdCAM-1^{-/-} mice we observed no matILFs at all. There were no significant differences in CP and imILF ratios between the *Nkx2-3*-deficient and heterozygous mice, and MAdCAM-1-deficient and wild-type C57BL/6 mice, respectively. Similarly to the first week, CPs were present at a lower ratio in *Nkx2-3^{+/-}* and *Nkx2-3^{-/-}* than in C57BL/6 and MAdCAM-1^{-/-} mice. Furthermore, imILF ratios were almost the same in each genotype at this time point.

On the fourth week matILFs were present in the colonic lamina propria of each mouse strain, but in MAdCAM-1^{-/-} colons their ratio was significantly lower compared to the wild-type C57BL/6 control group. In the absence of *Nkx2-3*, the matILF ratio was also lower than in *Nkx2-3^{+/-}* littermate controls. ImILFs were observed at a higher ratio in MAdCAM-1 knock-out (KO) mice than in the control C57BL/6 group, while CP ratio was lower in MAdCAM-1^{-/-} compared to C57BL/6 mice. *Nkx2-3^{-/-}* mice had a similar imILF percentage as in *Nkx2-3^{+/-}* mice but a higher ratio of CPs.

Our data demonstrate that the different forms of MAdCAM-1-deficiency variably affect colonic SILT development, as in the absence of *Nkx2-3* ILF maturation is only slightly altered in comparison to the relevant wild-type group, while MAdCAM-1^{-/-} mice had a more profound delay in colonic SILT maturation. These findings also demonstrate that although the absence of MAdCAM-1 delays colonic SILT maturation in the

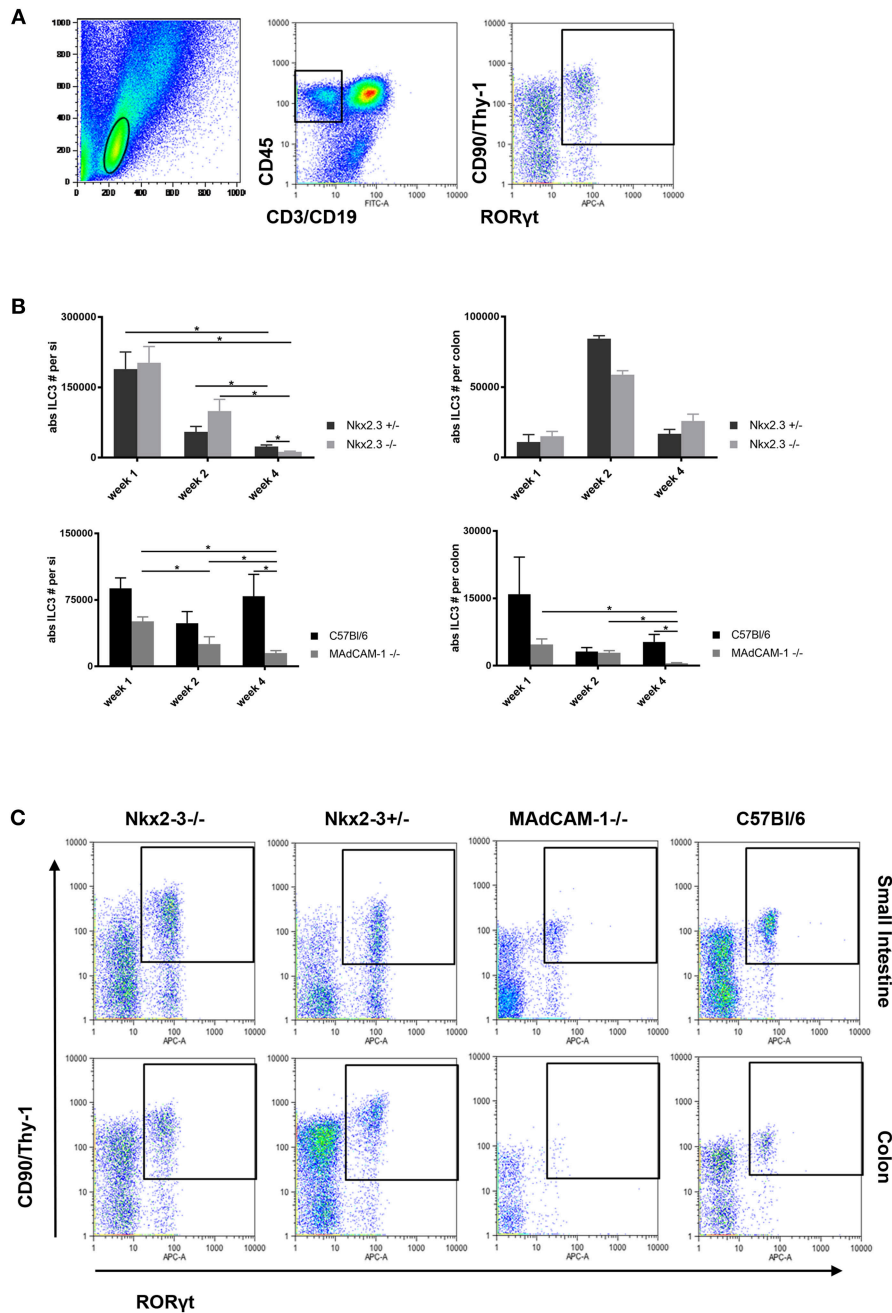


FIGURE 1 | Different distribution of ILC3 in the postnatal gut in Nkx2-3^{-/-} and MAdCAM-1^{-/-} mice. **(A)** Gating strategy for the identification of ILC3s defined on the basis the lymphoid gate (left: FSC/SSC ellipse) and CD45+/non-T/B lineage (middle: rectangle) combined with CD90/RORγt (right, rectangle); representative example from a small intestine of a 4 weeks old C57BL/6 mouse. **(B)** Kinetics of the absolute number of ILC3s in Nkx2-3^{-/-} and Nkx2-3^{+/-} mice (top) and MAdCAM-1^{-/-} and wild-type C57BL/6 (bottom) intestine (small intestine: left, colon: right) at various ages as indicated (*n* = 3–7, mean ± SEM, **p* < 0.05). **(C)** Representative example of the appearance of ILC3s in the small intestine and colon of Nkx2-3^{-/-}, Nkx2-3^{+/-}, MAdCAM-1^{-/-}, and wild-type C57BL/6 mice at 4 weeks of age.

early postnatal period, it does not prevent it. This delay is most pronounced on the second postnatal week, when Nkx2-3^{-/-} mice developed a few matILFs, while in MAdCAM-1^{-/-} mice matILFs appeared only on the fourth postnatal week at a greatly decreased ratio.

Altered mRNA for PNAd Core Proteins and Modifying Enzymes in MAdCAM-1^{-/-} Peyer’s Patches

MAdCAM-1 is the main addressin recruiting lymphocytes to Peyer’s patches (PP) and the intestine. As the lack of Nkx2-3

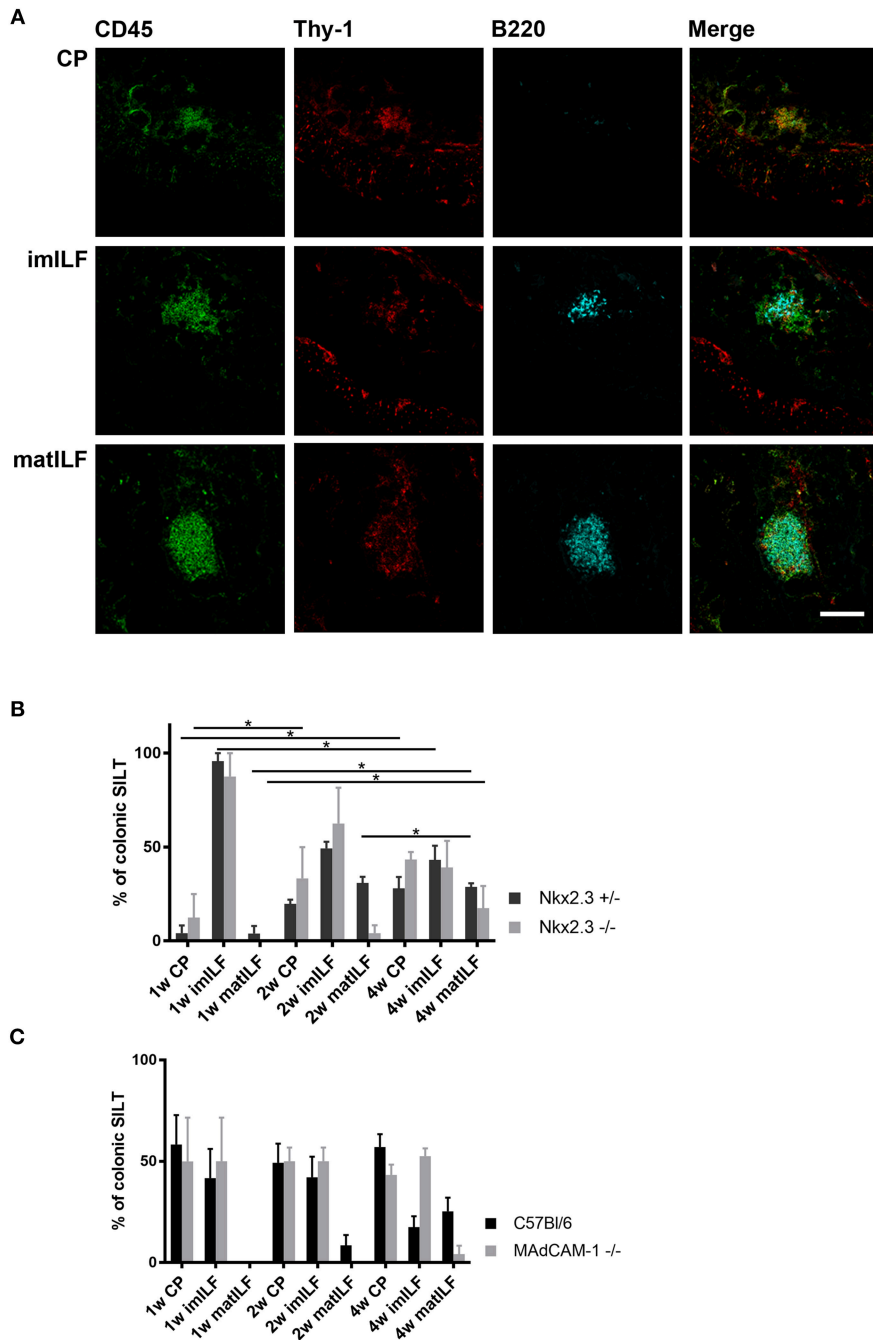


FIGURE 2 | Composition of postnatal colonic SILT spectrum. **(A)** Representative samples for cryptopatches (CP), immature (imILF), and mature (matILF) isolated lymphoid follicles of a 4 weeks old Nkx2-3^{+/-} mouse using CD45/Thy-1/B220 combined immunofluorescence staining with the markers as indicated (scale bar = 100 μm). **(B)** Composition of colonic SILT spectrum in Nkx2-3^{+/-} (black filled) and Nkx2-3^{-/-} (gray filled) mice at 1, 2, and 4 weeks of age as indicated; n = 4; mean ± SEM, *p < 0.05). **(C)** Composition of SILT spectrum in the colon of wild-type C57Bl/6 (black filled) and MAdCAM-1^{-/-} (gray filled) mice at 1, 2, and 4 weeks of age as indicated (n = 4; mean ± SEM *p < 0.05).

causes increased mRNA levels for various PNAd backbone proteins and modifying enzymes in PPs lacking endothelial MAdCAM-1 (12), next we studied whether similar alterations occur in MAdCAM-1^{-/-} mice. Using qPCR analysis of cDNA from PPs of 8–10 weeks old MAdCAM-1^{-/-} mice we observed a

significant increase of two PNAd backbone proteins Endomucin and Podocalyxin-like protein in MAdCAM-1^{-/-} PPs compared to wild-type controls, while the increase in CD34 did not reach statistical significance. The mRNA for Glycam1 and Nepmucin did not show any difference compared to control

PPs (**Figure 3A**). Among the modifying enzymes important in creating the PNAd epitope, mRNA for the betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3 sulfotransferase (B3gnt3) and alpha-(1, 3)-fucosyltransferase (Fut7) did not show statistically significant differences, whereas N-acetylglucosamine 6-O sulfotransferase (Chst4) was significantly elevated in MAdCAM-1^{-/-} PPs, resulting in a prominent expression of MECA-79 PNAd epitope (**Figure 3B**). These alterations are different from those reported earlier in Nkx2-3^{-/-} mice, where the most robust alteration of mRNA expression for PNAd core proteins involved Glycam1, but the significant increase of Chst4 was also observed (12).

Correlation of ILC3 Distribution and Regional Expression of Vascular Addressin in the Mucosa

To investigate whether the ILC3 distribution is correlated with the altered expression of MAdCAM-1 in Nkx2-3^{-/-} mice or PNAd in MAdCAM-1^{-/-} mice, next we compared the expression level using quantitative immunofluorescence and Image J analysis.

In Nkx2-3^{-/-} mice we found a higher level of MAdCAM-1 expression at week 1 and even a minor increase by the second postnatal week, while by the 4th postnatal week the MAdCAM-1 labeling intensity was statistically below that of the Nkx2-3 heterozygotes in the small intestine. In contrast, the colonic MAdCAM-1 expression in Nkx2-3^{-/-} samples was continuously below that of heterozygotes, suggesting in different gut segments the loss of MAdCAM-1 expression follows different kinetics (**Figure 4A**). Furthermore, the MAdCAM-1 expression does not correlate with the local ILC3 numbers detailed above (**Figure 1B**).

In the small intestine of MAdCAM-1^{-/-} mice we observed a slight increase of PNAd expression by the second week below that of C57BL/6 mice, which continued to increase significantly by the fourth week, exceeding that of wild-type controls. Correlating the number of ILC3s with the alterations of small intestinal PNAd in C57BL/6 mice the ILC3 number remained relatively stable, while the PNAd expression steadily increased, whereas in MAdCAM-1^{-/-} mice was accompanied by significantly decreased ILC3 numbers.

The colonic PNAd expression in MAdCAM-1^{-/-} mice showed a significant increase already by the second week compared to the controls, followed by a further increase by the fourth week (**Figure 4B**). However, ILC3 cell numbers decreased in both MAdCAM-1^{-/-} and wild-type mice, where at fourth week of age the colonic ILC3 cells were barely detectable in MAdCAM-1^{-/-} mice (**Figure 1B**).

Preserved Lymph Node Architecture and Normal T Cell-Dependent Antibody Response in the Absence of MAdCAM-1

During the embryonic development and early postnatal maturation of peripheral lymph nodes (pLN) HEVs display MAdCAM-1 recognized by $\alpha 4\beta 7$ integrin (2, 4). Therefore, we next investigated whether the formation and structure of

pLNs is affected by the absence of MAdCAM-1 similarly to the SILT. Using multicolor immunofluorescence for T and B cells and follicular dendritic cells we found no noticeable differences in the lymphoid compartmentalization and follicular stromal organization in young adult (8 week old) mice (**Figure 5**).

To examine how the absence of MAdCAM-1 affects the induction of a local T-dependent immune response, mice received two subcutaneous injections of ovalbumin (OVA) in their footpads 7 days apart. Twenty-one days after the first injection mice were sacrificed and serum was collected. We determined the anti-OVA IgG response using a custom-made indirect ELISA. Interestingly, we found that lack of MAdCAM-1 did not inhibit the production of IgG against ovalbumin as neither MAdCAM-1^{-/-} nor Nkx2-3^{-/-} mice had significantly lower antibody levels compared to their appropriate controls (data not shown).

These results indicate that, in addition to allowing the establishment of normal architecture, in the absence of MAdCAM-1 the development of a T-dependent antibody response in peripheral lymph nodes is preserved.

DISCUSSION

Type 3 innate lymphoid cells (ILC3s) have recently been demonstrated to play a role in several immunological processes associated with normal mucosal lymphoid tissue formation and also inflammation and epithelial regeneration in inflammatory bowel diseases (IBD). IBD manifests as a consequence of genetic susceptibility, aberrant immunological responsiveness against commensal bacteria, and bacterial dysbiosis of the intestine (21, 22). Amongst other genetic factors, Nkx2-3 has been identified as a susceptibility factor for both ulcerative colitis and Crohn's disease in humans, characterized by ectopic lymphoid neogenesis (23). In these events ILC3 subsets in a close relationship with their intestinal stromal microenvironment produce a range of cytokines, and as putative antigen-presenting cells, they can also influence T-cell responses against commensal bacteria (24, 25). To exert local activities, various lymphoid cells need to recognize MAdCAM-1 addressin displayed by mucosal high endothelial venules and lamina propria vessels, which also offers a potential target mechanism for IBD amelioration, using either anti- $\alpha 4\beta 7/\alpha 4\beta 1$ integrin antibodies or anti-MAdCAM-1 therapy, respectively (26). Although the efficiency of ILC3s critically depends on their intestinal colonization, it is not yet known how the regulatory or genomic absence of MAdCAM-1 affects the intestinal distribution of ILC3s and the maturation of colonic lymphoid follicles as immunological effector sites.

As a critical postnatal regulator promoting MAdCAM-1 expression (8, 27), we studied mice deficient for Nkx2-3 transcription factor. Although in Nkx2-3 KO mice endothelial MAdCAM-1 gradually disappears and is replaced by PNAd during the first month (4), the lack of Nkx2-3 does not abrogate the expression of non-endothelial MAdCAM-1. Therefore its effect appears to be lineage-restricted (14), in contrast to the MAdCAM-1^{-/-} mice (18). We also noted increased

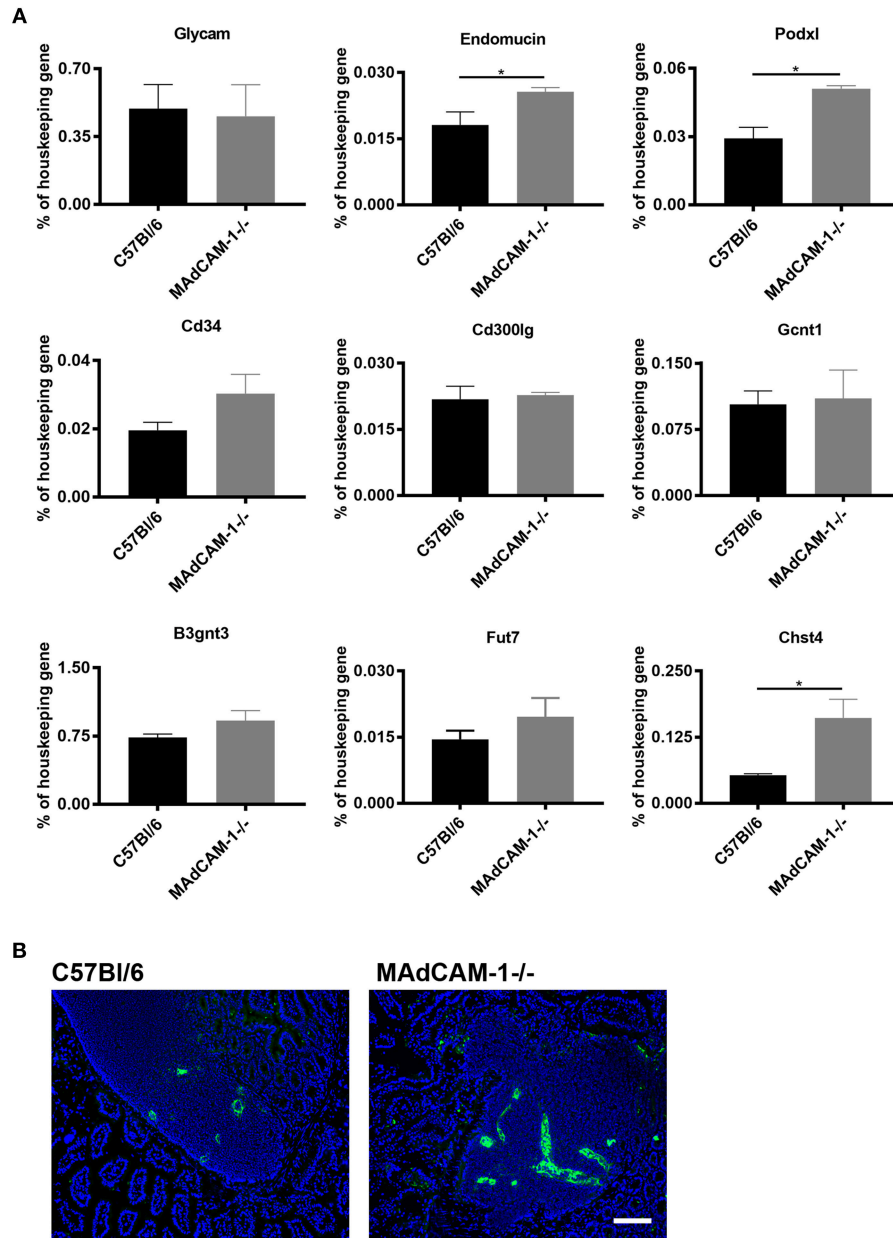


FIGURE 3 | Comparison of expression of mRNA expression for peripheral lymph node addressin core proteins and glycosylation enzymes in Peyer's patches between MAdCAM-1^{-/-} and wild-type mice and the expression of MECA-79 PNAd epitope. **(A)** qPCR analyses were performed for the various core proteins (GlyCAM, endomucin, podocalyxin-like protein, CD34, and nepmucin) and glycosylation enzymes, expressed as a mRNA level relative to β -actin ($n = 6$; mean \pm SEM, in a duplicate measurement; * $p < 0.05$). **(B)** Immunofluorescence detection of MECA-79 epitope (green) in wild-type (left) and MAdCAM-1^{-/-} Peyer's patches with Hoechst nuclear counterstaining (blue) (representative example of a cohort of 3 mice; scale bar = 100 μ m).

expression of PNAd epitope MECA-79; however, comparison of PNAd core protein and glycosylation enzyme mRNA expression alterations to those in Nkx2-3-deficient mice reported earlier (12) show notable differences. In Nkx2-3^{-/-} mice the most dramatic alteration of mRNA expression was the robust increase of Glycam1 mRNA; in contrast, in MAdCAM-1^{-/-} mice the mRNA for Glycam1 was unaltered, while mRNA for podocalyxin-like protein (Pdxn), endomucin and,

to a lesser degree, CD34 increased. Moreover, in both cases sulfotransferase enzyme Chst4 increased. These findings indicate that in the two different models of MAdCAM-1 deficiency the compensatory upregulation of PNAd epitopes follows different mRNA expression patterns.

Irrespective of their genotype and background, small intestines host more ILC3 cells than the colon, with the peak occurring on the first postnatal week. At this period the

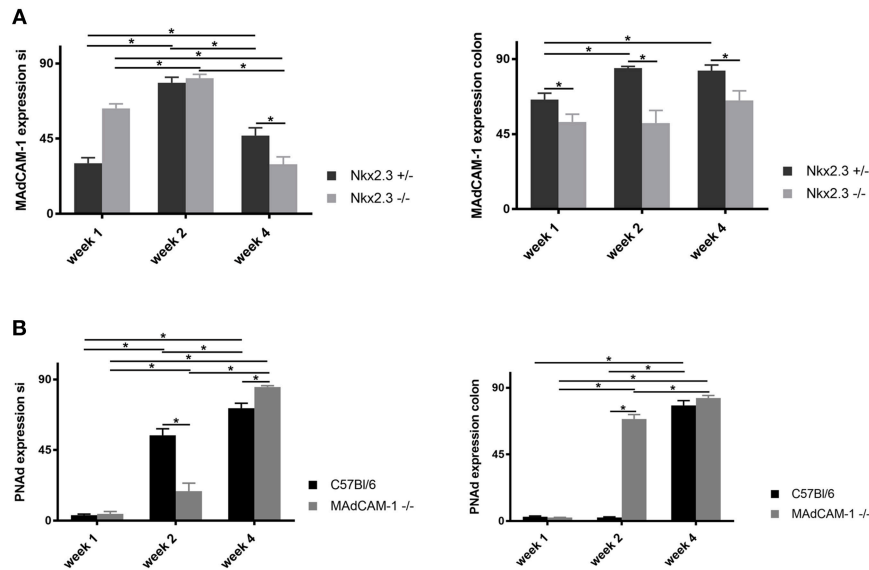


FIGURE 4 | Quantification of the expression of endothelial addressins in the postnatal period. **(A)** Relative pixel intensities (mean gray values, y-axis) of MAdCAM-1 labeling of small intestine (left) and colon (right) in Nkx2-3^{+/-} (black filled) and Nkx2-3^{-/-} (gray filled) at the periods indicated at the x-axis ($n = 5$, mean \pm SEM, in a duplicate measurement; $*p < 0.05$). **(B)** Relative pixel intensities (mean gray values, y-axis) of PNAd labeling of small intestine (left) and colon (right) in C57Bl/6 (black filled) and MAdCAM-1^{-/-} (gray filled) at the periods indicated at the x-axis ($n = 5$, mean \pm SEM, in a duplicate measurement; $*p < 0.05$).

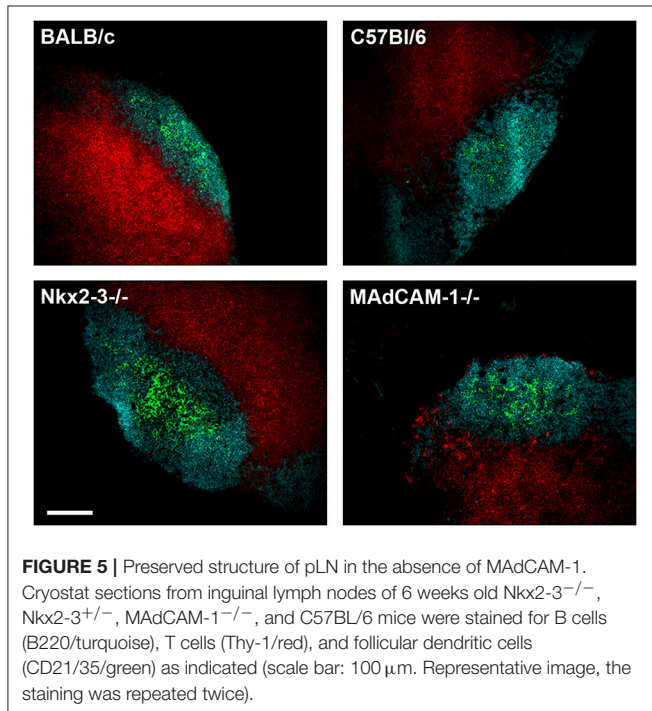


FIGURE 5 | Preserved structure of pLN in the absence of MAdCAM-1. Cryostat sections from inguinal lymph nodes of 6 weeks old Nkx2-3^{-/-}, Nkx2-3^{+/-}, MAdCAM-1^{-/-}, and C57Bl/6 mice were stained for B cells (B220/turquoise), T cells (Thy-1/red), and follicular dendritic cells (CD21/35/green) as indicated (scale bar: 100 μ m. Representative image, the staining was repeated twice).

dominant addressin in the peripheral lymph nodes of wild-type and Nkx2-3-deficient mice is MAdCAM-1 (4, 12), and we noted no significant difference between Nkx2-3 deficient and heterozygous samples, indicating efficient seeding of ILC3s to the small intestine mucosa. However, the number of cells showed substantial differences between Nkx2-3-deficient and

heterozygous mice on a BALB/c background, and C57Bl/6-background MAdCAM-1^{-/-} and wild-type mice, which may be related to the delayed maturation of siILF in C57Bl/6 mice, as reported earlier (28). On the other hand, at later periods Nkx2-3-deficient mice showed a reduced number of small intestinal ILC3s, coupled with a markedly lower frequency of mature ILFs, presumably reflecting the effect of the progressive reduction of endothelial MAdCAM-1 expression.

Interestingly, the pattern of PNAd core protein and glycosylation enzyme expression in PPs of MAdCAM-1^{-/-} mice is different compared to both Nkx2-3^{-/-} and wild-type C57Bl/6 mice, and it also allows the appearance of MECA-79 epitope. It remains to be investigated, whether in a fashion similar to Nkx2-3^{-/-} PPs, the MAdCAM-1/ α 4 β 7-dependent mucosal mechanism is also replaced—at least partially—by an L-selectin/PNAd-dependent homing (12). Nevertheless, the appearance of cryptopatches and their initial maturation into imILFs is in agreement with previous data on the formation of cryptopatches being independent from α 4 β 7 integrin-MAdCAM-1 interaction (27).

In contrast, colonic ILC3 dispersion showed strikingly different kinetics. Compared to the small intestines, on the first week we found relatively fewer ILC3 cells in all genotypes. However, by the second week the colonic ILC3 number increased in Nkx2-3-deficient and heterozygous mice, whereas it was further reduced in both MAdCAM-1^{-/-} and C57Bl/6 mice, similar to the difference between the small intestines of BALB/c and C57Bl/6 mice (28, 29). This reduction continued in MAdCAM-1^{-/-} mice to a virtually undetectable level, whereas it remained unchanged in C57Bl/6 samples. Furthermore, the lack of MAdCAM-1 caused a more dramatic reduction in the

colonic ILC3 number compared to that in the small intestine, indicating that in the small intestine potential alternative endothelial addressins may partially compensate for the absence of MAdCAM-1, in addition to other differences of developmental requirements for small intestinal and colonic ILF formation (30). With regard to the effect of the absence of Nkx2-3 in young adult mice on other innate lymphoid subsets, we found an increased level of Th17 and Treg cells in the colon (20); however, it remains to be investigated how other ILC subsets are affected either in Nkx2-3^{-/-} or MAdCAM-deficient mice. Our recent findings also indicate the expression of Nkx2-3 in VAP-1-positive myofibroblasts cells, thus the modulatory effect on ILC3 distribution is likely to be mediated through stromal components (20).

Differences in the maturation of colonic ILFs can be attributed to several factors. Importantly, mice on a C57BL/6 background showed a delayed maturation, evidenced through the cryptpatch:ILF ratio, but by the fourth postnatal week C57BL/6 mice had a similar ratio of mature ILFs as in Nkx2-3-deficient mice. Interestingly, the relatively stable number of CPs in C57BL/6 mice at this age was associated with fewer immature ILFs, suggesting that in these mice the course of CP-immature ILF maturation may be delayed compared to CP appearance and/or immature ILF-mature ILF transformation, in a fashion similar to the difference between C57BL/6 and BALB/c mice observed in the small intestine (28, 29). Furthermore, in MAdCAM-1^{-/-} mice the appearance of CPs and their initial maturation into immature ILFs largely correspond to those of wild-type C57BL/6, suggesting MAdCAM-1 independence (27), but its further maturation into mature ILFs is drastically blocked (although not completely abolished) in MAdCAM-1^{-/-} mice. In this process the increased expression of PNAd addressin appears to be unable to compensate for the loss of MAdCAM-1 in sustaining immature-to-mature ILF transition, also reflected to a lesser degree in Nkx2-3^{-/-} mice with partially preserved MAdCAM-1 expression.

Lastly, we also investigated the systemic effect of MAdCAM-1 deficiency on the formation and immune responsiveness, as $\alpha 4\beta 7$ integrin-MAdCAM-1 also participates in peripheral lymph nodes formation during the embryonic period, similarly to the development of PPs (4). We found that, although both PP development and ILF maturation are blocked in

MAdCAM-1^{-/-} mice, the peripheral lymph nodes showed no detectable structural and functional differences compared to wild-type mice, suggesting the involvement of other endothelial ligands in the local accumulation of ILC3/lymphoid tissue inducer (LTi) cells in the lymph node anlage (31). The partial reservation of ILC3s seeding (with the potential of perpetuating the intestinal lymphoid neogenesis) to mucosal locations or for LTi subset of ILC3s in embryonic lymph node anlage even in the complete absence of MAdCAM-1 may reflect some degree of endothelial plasticity in addressin display, which may question the efficacy of anti-adhesion therapeutic interventions in IBD. It remains to be determined how the vasculature in developing peripheral lymph nodes and mucosal territories can collect leukocytes, including ILC subsets, in the absence of MAdCAM-1, thus expanding the involvement if other adhesion molecules to be considered as potential targets in limiting intestinal inflammatory diseases.

DATA AVAILABILITY

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DV and PB devised experiments. DV, ZK, FG, and PB performed experiments. GB operated the confocal microscope. ZK, DV, and PB analyzed and interpreted the results. KF performed statistical analysis. AS and NW evaluated data, edited and commented on manuscript, which was written by DV, ZK, and PB.

FUNDING

ZK is supported by the ÚNKP-17-4-I-PTE-83 New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities of Hungary and the postdoctoral research grant of the Faculty of Medicine, University of Pécs. AS and NW are supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHI 1170/2-1 and WA 1127/4-1). PB is supported by the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K108429). This project is supported by PEPSYS-GINOP-2.3.2-15-2016-00050 and EFOP-3.6.1-16-2016-00004.

REFERENCES

- Buettner M, Lochner M. Development and function of secondary and tertiary lymphoid organs in the small intestine and the colon. *Front Immunol.* (2016) 7:342. doi: 10.3389/fimmu.2016.00342
- Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol.* (2003) 3:292–303. doi: 10.1038/nri1054
- Eberl G, Marmon S, Sunshine MJ, Rennett PD, Choi Y, Littman DR. An essential function for the nuclear receptor ROR γ (t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol.* (2004) 5:64–73. doi: 10.1038/ni1022
- Mebius RE, Streeter PR, Michie S, Butcher EC, Weissman IL. A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4⁺ CD3⁻ cells to colonize lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1996) 93:11019–24. doi: 10.1073/pnas.93.20.11019
- Adachi S, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S. Three distinctive steps in Peyer's patch formation of Mmurine embryo. *Int Immunol.* (1997) 9:507–14. doi: 10.1093/intimm/9.4.507
- Hashi H, Yoshida H, Honda K, Fraser S, Kubo H, Awane M, et al. Compartmentalization of Peyer's patch anlagen before lymphocyte eEntry. *J Immunol.* (2001) 166:3702–9. doi: 10.4049/jimmunol.166.6.3702
- Ivanov II, Diehl GE, Littman DR. Lymphoid tissue inducer cells in intestinal immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* (2006) 308:59–82. doi: 10.1007/3-540-30657-9_3
- Pabst O, Forster R, Lipp M, Engel H, Arnold HH. NKX2.3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen

- and mucosa-associated lymphoid tissue. *EMBO J.* (2000) 19:2015–23. doi: 10.1093/emboj/19.9.2015
9. Pabst O, Schneider A, Brand T, Arnold HH. The mouse Nkx2-3 homeodomain gene is expressed in gut mesenchyme during pre- and postnatal mouse development. *Dev Dynam.* (1997) 209:29–35. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199705)209:1<29::AID-AJA3>3.0.CO;2-Z
 10. Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN. Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays.* (2007) 29:166–77. doi: 10.1002/bies.20528
 11. Czömpöly T, Lábadi Á, Kellermayer Z, Olasz K, Arnold HH, Balogh P. Transcription Factor Nkx2-3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen. *J Immunol.* (2011) 186:6981–9. doi: 10.4049/jimmunol.1003770
 12. Kellermayer Z, Mihalj M, Labadi A, Czompoly T, Lee M, O'Hara E, et al. Absence of Nkx2-3 homeodomain transcription factor reprograms the endothelial addressin preference for lymphocyte homing in Peyer's patches. *J Immunol.* (2014) 193:5284–93. doi: 10.4049/jimmunol.1402016
 13. Pabst O, Zweigerdt R, Arnold HH. Targeted disruption of the homeobox transcription factor Nkx2-3 in mice results in postnatal lethality and abnormal development of small intestine and spleen. *Development.* (1999) 126:2215–25.
 14. Wang C, Biben C, Robb L, Nassir F, Barnett L, Davidson N, et al. Homeodomain factor Nkx2-3 controls regional expression of leukocyte homing coreceptor MAdCAM-1 in specialized endothelial cells of the viscera. *Dev Biol.* (2000) 224:152–67. doi: 10.1006/dbio.2000.9749
 15. Hsia LT, Ashley N, Ouaret D, Wang LM, Wilding J, Bodmer WF. Myofibroblasts are distinguished from activated skin fibroblasts by the expression of AOC3 and other associated markers. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2016) 112:113. doi: 10.1073/pnas.1603534113
 16. Fisher S, Tremelling M, Anderson C, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott N, et al. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Gen.* (2018) 40:710–2. doi: 10.1038/ng.145
 17. Parkes M, Barrett J, Prescott N, Tremelling M, Anderson C, Fisher S, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Gen.* (2007) 39:830–2. doi: 10.1038/ng2061
 18. Schippers A, Leuker C, Pabst O, Kochut A, Prochnow B, Gruber AD, et al. Mucosal addressin cell adhesion molecule-1 controls plasma-cell migration and function in the small intestine of mice. *Gastroenterol.* (2009) 137:924–33. doi: 10.1053/j.gastro.2009.05.039
 19. Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, Dulauroy S, Berard M, Kleinschek M et al. RORgammat+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat Immunol.* (2011) 12:320–6. doi: 10.1038/ni.2002
 20. Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, et al. IL-22-independent protection from colitis in the absence of Nkx2.3 transcription factor in mice. *J Immunol.* (2019) 202:ji1801117. doi: 10.4049/jimmunol.1801117
 21. Geremia A, Arancibia-Cárcano CV. Innate lymphoid cells in intestinal inflammation. *Front Immunol.* (2017) 8:1296. doi: 10.3389/fimmu.2017.01296
 22. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut.* (2004) 53:1–4. doi: 10.1136/gut.53.1.1
 23. Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* (2008) 8:458–66. doi: 10.1038/nri2340
 24. Kellermayer Z, Vojkovics D, Balogh P. Innate lymphoid cells and their stromal microenvironments. *Immunol Lett.* (2017) 189:3–9. doi: 10.1016/j.imlet.2017.04.008
 25. Hepworth M, Monticelli L, Fung T, Ziegler C, Grunberg S, Sinha R, et al. Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature.* (2013) 498:113–7. doi: 10.1038/nature12240
 26. Zundler S, Becker E, Weidinger C, Siegmund B. Anti-adhesiontherapies in inflammatory bowel disease-molecular and clinical aspects. *Front Immunol.* (2017) 8:891. doi: 10.3389/fimmu.2017.00891
 27. Wang C, McDonough JS, McDonald KG, Huang C, Newberry RD. Alpha4beta7/MAdCAM-1 interactions play an essential role in transitioning cryptopatches into isolated lymphoid follicles and a nonessential role in cryptopatch formation. *J Immunol.* (2008) 181:4052–61. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.4052
 28. Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S, et al. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol.* (2002) 168:57–64. doi: 10.4049/jimmunol.168.1.57
 29. Pabst O, Herbrand H, Worbs T, Friedrichsen M, Yan S, Hoffmann MW, et al. Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol.* (2005) 35:98–107. doi: 10.1002/eji.200425432
 30. Knoop KA, Butler BR, Kumar N, Newberry RD, Williams IR. Distinct developmental requirements for isolated lymphoid follicle formation in the small and large intestine: RANKL is essential only in the small intestine. *Am J Pathol.* (2011) 179:1861–71. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.06.004
 31. Berlin-Rufenach C, Otto F, Mathies M, Westermann J, Owen MJ, Hamann A, et al. Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *J Exp Med.* (1999) 189:1467–78. doi: 10.1084/jem.189.9.1467

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Vojkovics, Kellermayer, Gábris, Schippers, Wagner, Berta, Farkas and Balogh. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

IL-22–Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice

Zoltán Kellermayer,^{*,†} Dóra Vojtkovics,^{*,†} Tareq Abu Dakah,^{*} Kornélia Bodó,^{*} Bálint Botz,^{*,§} Zsuzsanna Helyes,^{*,¶} Gergely Berta,^{||} Béla Kajtár,[#] Angela Schippers,^{**,*} Norbert Wagner,^{**,*} Luigi Scotto,^{††} Owen A. O'Connor,^{‡‡} Hans-Henning Arnold,^{§§} and Péter Balogh^{*,†}

The transcription factor Nkx2.3 regulates the vascular specification of Peyer patches in mice through determining endothelial addressin preference and may function as a susceptibility factor in inflammatory bowel diseases in humans. We wished to analyze the role of Nkx2.3 in colonic solitary intestinal lymphoid tissue composition and in colitis pathogenesis. We studied the colonic solitary intestinal lymphoid tissue of Nkx2.3-deficient mice with immunofluorescence and flow cytometry. Colitis was induced in mice using 2.5% dextran sodium sulfate, and severity was assessed with histology, flow cytometry, and quantitative PCR. We found that the lack of Nkx2.3 impairs maturation of isolated lymphoid follicles and attenuates dextran sodium sulfate–induced colitis independent of endothelial absence of mucosal addressin cell-adhesion molecule-1 (MAdCAM-1), which was also coupled with enhanced colonic epithelial regeneration. Although we observed increased numbers of group 3 innate lymphoid cells and Th17 cells and enhanced transcription of IL-22, Ab-mediated neutralization of IL-22 did not abolish the protection from colitis in Nkx2.3-deficient mice. Nkx2.3^{-/-} hematopoietic cells could not rescue wild-type mice from colitis. Using LacZ-Nkx2.3 reporter mice, we found that Nkx2.3 expression was restricted to VAP-1⁺ myofibroblast-like pericryptal cells. These results hint at a previously unknown stromal role of Nkx2.3 as driver of colitis and indicate that Nkx2.3⁺ stromal cells play a role in epithelial cell homeostasis. *The Journal of Immunology*, 2019, 202: 000–000.

The immune system of the intestine must cope with a massive load of alimentary and microbial Ags and distinguish between those to tolerate and those to eliminate. These functions are carried out by two different types of intestinal lymphoid tissues (1). Peyer patches (PPs) in the small intestine and colonic patches in the large intestine form during embryonic development, whereas solitary intestinal lymphoid tissue (SILT) components develop postnatally. The SILT spectrum consists of cryptopatches (CP) containing mainly hematopoietic lineage⁻ cells at the bottom of intestinal crypts (2). Upon environmental stimulation, these leukocyte congregates transform into isolated lymphoid follicles (ILFs) (3, 4). During this process, lymphocytes

are recruited to form follicles via MAdCAM-1 expressed on high endothelial venules (HEVs) and lamina propria vessels (5, 6).

In mice, the vascular specification of PPs is critically determined by the Nkx2.3 homeodomain transcription factor in a tissue-specific manner. In the absence of Nkx2.3 in mice, PPs and the spleen lack most of MAdCAM-1 (7, 8) and exhibit a vasculature reminiscent of peripheral lymph nodes with peripheral node addressin (PNAd)⁺ HEVs (9, 10). In addition to its role in vascular specification of intestinal lymphoid tissues, Nkx2.3 also affects the maturation of villi, as its lack causes aberrant villus formation during the embryonic and early postnatal period of gut development. Meanwhile, in adulthood, small intestines of mice

^{*}Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, Szentágotthai János Research Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary; [†]Lymphoid Organogenesis Research Group, Szentágotthai János Research Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary; [‡]Molecular Pharmacology Research Group, Szentágotthai János Research Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary; [§]Department of Radiology, Clinical Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary; [¶]Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary; ^{||}Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory, Medical School, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary; ^{||}Department of Pathology, Clinical Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary; ^{**}Department of Pediatrics, Medical Faculty, RWTH Aachen University, Aachen 52074, Germany; ^{††}Department of Experimental Therapeutics, Columbia University Medical Center, New York 10019, NY; ^{‡‡}Center for Lymphoid Malignancies, Columbia University Medical Center, New York 10019, NY; and ^{§§}Department of Cell and Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Biotechnology, Technical University of Braunschweig, Braunschweig 38106, Germany

ORCID: 0000-0001-9560-6424 (Z.K.); 0000-0003-3388-0019 (D.V.); 0000-0001-9429-4377 (K.B.); 0000-0003-1452-2443 (L.S.).

Received for publication August 9, 2018. Accepted for publication December 31, 2018.

This work was supported by the ÚNKP-17-4-I-PTE-83 New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities of Hungary and a postdoctoral research grant from the Faculty of Medicine, University of Pécs (to Z.K.). B.B. was supported by the ÚNKP-17-4-I-PTE-96 New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities. P.B. is supported by the Hungarian Scientific Research Fund

(OTKA K108429), and Z.H. is supported by the National Research, Development and Innovation Office of Hungary (PEPSYS-GINOP-2.3.2-15-2016-00050 and EFOP-3.6.1-16-2016-00004).

Z.K. and P.B. devised experiments; Z.K., D.V., T.A.D., K.B., and P.B. performed experiments; B.B. and Z.H. performed ex vivo imaging; G.B. operated the confocal microscope; B.K. performed blinded pathological scoring of H&E samples; Z.K., D.V., and P.B. analyzed and interpreted the results; L.S., O.A.O., H.-H.A., A.S., and N.W. evaluated data and edited and commented on the manuscript, which was written by Z.K. and P.B.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Péter Balogh, Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Clinical Center, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary. E-mail address: balogh.peter@pte.hu

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CD, Crohn disease; CD19CL, mCD19CherryLuciferase; CP, cryptopatch; CR2, complement receptor type 2; DC, dendritic cell; DSS, dextran sodium sulfate; EdU, 5-ethynyl-2-deoxyuridine; FDC, follicular dendritic cell; HEV, high endothelial venule; IBD, inflammatory bowel disease; ILC3, group 3 innate lymphoid cell; ILF, isolated lymphoid follicle; LT_i, lymphoid tissue inducer-type; PNA, peanut agglutinin; PNAd, peripheral node addressin; PP, Peyer patch; qPCR, quantitative PCR; ROI, region of interest; SILT, solitary intestinal lymphoid tissue; T_{reg}, regulatory T cell; VAP-1, vascular associated protein-1.

Copyright © 2019 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/19/\$37.50

lacking Nkx2.3 present with significantly enlarged villi (11). In humans, single nucleotide polymorphisms in the coding region of Nkx2.3 were found to be associated with both Crohn disease (CD) and ulcerative colitis, the two main types of inflammatory bowel disease (IBD) (12, 13). Nkx2.3 has been shown to regulate the expression of PTPN2, a risk gene for CD (14), and VEGF signaling and endothelin 1 production in intestinal microvascular cells (15).

Although these results point to the involvement of Nkx2.3 in IBD, the details of Nkx2.3-mediated mechanisms underlying intestinal inflammatory processes are still unresolved. In this article, we show that Nkx2.3-deficient mice (Nkx2.3^{-/-}) harbor a SILT spectrum with impaired maturation of ILFs and are protected from dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. Alleviated colitis is independent of MAdCAM-1, as MAdCAM-1-deficient mice (MAdCAM-1^{-/-}) develop severe colitis compared with Nkx2.3^{-/-} mice, whereas it is coupled with enhanced colonic epithelial regeneration. Diminished colitis in Nkx2.3-deficient mice is associated with increased numbers of colonic ROR γ ⁺ group 3 innate lymphoid cells (ILC3s), Th17 cells, and Foxp3⁺ regulatory T cells (T_{regs}). Increased IL-22 levels in DSS-treated Nkx2.3^{-/-} mice did not contribute to protection as IL-22 blockade had no effect on disease pathogenesis. Nkx2.3^{-/-} hematopoietic cells failed to provide protection, highlighting the importance of Nkx2.3-expressing intestinal stromal cells in the functionality of the colonic epithelium and various lymphoid cells.

Materials and Methods

Mice

BALB/cJ and C57BL/6J mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Nkx2.3^{-/-} mice (11) were backcrossed through at least 20 generations onto BALB/c background (9). MAdCAM-1^{-/-} (Madcaml^{tm1.2Nwag}) mice (16), mCD19CherryLuciferase (CD19CL) transgenic mice (17), and LacZ-Nkx2.3^{+/-} reporter mice (8) were described previously. eGFP-TgBALB/c mice (18) were maintained in our laboratory. Prior to experiments, mice were accustomed to standard housing conditions for at least 1 wk. Mice were provided ad libitum with a VRF1 (P) diet (Special Diets Services) and fresh water and were kept on aspen bedding (Abedd). Eight- to ten-week-old mice were used throughout experiments. To induce colitis, mice received 2.5% DSS (AppliChem) in drinking water for 7 d. Mice were sacrificed on day 7 for acute or day 14 for subacute colitis. For controls, either littermates were used, or bedding was regularly exchanged between cages. All procedures involving live animals were carried out in accordance with the guidelines set out by the Ethics Committee on Animal Experimentation (University of Pécs, Pécs, Hungary) under license number BA02/2000-16/2015, with approval for the use of genetically modified organisms under license number SF/27-1/2014 issued by the Ministry of Rural Development, Budapest, Hungary. Throughout the experiments, the authors adhered to Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines.

Histology

Colons were embedded in OCT medium (Bio-Optica, Milan, Italy), snap-frozen, and sectioned at 8 μ m. H&E stainings of Swiss roll colons were performed at the Department of Pathology, University of Pécs, according to standard protocols. Histopathological scoring of H&E samples was performed by an experienced pathologist in a blinded fashion based on a modified version of standard protocols (19), with evaluation of submucosal edema (0–3), polymorphonuclear cell infiltration (0–4), number of goblet cells (0–3), and epithelial integrity (0–3). For SILT ratio analysis, sections were made from colonic Swiss rolls at four different planes distributed evenly apart. SILT structures were identified as follows: CP, Thy-1⁺/B220⁻; immature ILF, Thy-1^{-/+}/B220⁺; complement receptor type 2 (CR2)^{-/+}; and mature ILF, B220⁺/CR2⁺/peanut agglutinin (PNA)⁺. Immunofluorescence was performed as previously described (10) using the following commercially available Abs: goat anti-mouse CXCL13 (R&D Systems) developed with donkey anti-goat FITC (SouthernBiotech), biotinylated CD11c (clone N418; BioLegend) developed with Streptavidin PE (BD Biosciences), and biotinylated PNA (Sigma-Aldrich) developed with AMCA Streptavidin (Vector Laboratories). The following Ab clones

were obtained from the American Type Culture Collection or produced in our laboratory, and then the Abs were purified and labeled in our laboratory: CD45-FITC (clone IBL-3/16), rat anti-mouse MAdCAM-1-AF555 (clone MECA-367), rat anti-mouse PNAd-Dylight594 (clone MECA-79, kindly provided by Dr. E. Butcher), B220-CF647 (clone 6B2), Thy-1-AF594 (clone IBL-1), and CD21/35-FITC (clone 7G6). Sections were viewed using an Olympus FLUOVIEW FV1000 laser scanning confocal imaging system or an Olympus BX61 fluorescent microscope.

Combined LacZ/ β -galactosidase enzyme histochemistry and immunohistochemistry

Swiss rolls containing colonic samples prepared from LacZ-Nkx2.3 reporter mice (8) and BALB/c mice were cryosectioned at 8- μ m thickness and fixed in cold acetone. After drying, the endogenous peroxidase activity was quenched by 1 mg/ml phenyl-hydrazine-hydrochloride in PBS for 30 min, followed by washing. Following saturation with 5% BSA/PBS, sections were incubated with rat mAbs against vascular associated protein-1 (VAP-1) Ag (clone 7-88/1, kindly provided by Dr. S. Jalkanen), EpCAM (clone G8.8), endothelial marker IBL-20 (produced at the Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs), or control rat IgG (each at 5 μ g/ml) in PBS for 45 min, followed by washing. Bound Abs were detected using the ImmPRESS-HRP goat anti-rat IgG kit (Vector Laboratories) with DAB/H₂O₂ according to the vendor's recommendations. After washing, slides were incubated with X-gal (1 mg/ml; Boehringer-Mannheim) dissolved in 5 mM K-hexacyanoferrate, 5 mM K-ferrocyanide, and 2 mM Mg-chloride (all from Sigma-Aldrich) in PBS overnight at 37°C, followed by extensive washing in PBS.

5-ethynyl-2-deoxyuridine staining

Epithelial cell proliferation was detected with the Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Following 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) detection, epithelial cells were identified using rat anti-mouse EpCAM (clone G8.8) developed with PE-labeled anti-rat (BD Biosciences).

Apoptosis assay

Epithelial cell apoptosis was measured using the Click-iT Plus TUNEL Assay for In Situ Apoptosis Detection, Alexa Fluor 488 (Life Technologies), according to the manufacturer's protocol. Following the TUNEL assay, epithelial cells were identified using rat anti-mouse EpCAM (clone G8.8) developed with PE-labeled anti-rat (BD Biosciences).

Serum IL-22 measurement

Serum IL-22 was detected with the Mouse/Rat IL-22 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) according to the manufacturer's protocol in duplicates. A standard curve was generated using a four-parameter logistic curve-fit, and concentrations were calculated for each sample.

Flow cytometry

Lamina propria lymphocytes were isolated using a modified version of the protocol described previously (20). Briefly, colons were cut open longitudinally, washed with PBS, then shaken at 37°C in DMEM containing 15 mM EDTA (Sigma-Aldrich) for 25 min. Intestines were then washed thoroughly with cold PBS, cut into 5-mm pieces, and incubated in DMEM containing 0.6 mg/ml collagenase D and 5 U/ml DNase I (both from Sigma-Aldrich) at 37°C for 20 min. Supernatant was collected and filtered through a 70- μ m cell strainer (Greiner Bio-One) and new digestion solution was added. Cycles were repeated until complete digestion of tissues. Mononuclear cells were collected with a 40/80% (w/v) Percoll (Sigma-Aldrich) density gradient centrifugation, washed with PBS, and labeled for flow cytometry using the following commercially available Abs: CD3-allophycocyanin-Cy7 (clone 145-2C11; BD Biosciences), ROR γ -AF647 (clone Q31-378; BD Biosciences; intracellular staining was performed according to the manufacturer's protocol), biotinylated CD11c (clone N418; BioLegend) developed with Streptavidin PE-Cy7 (BioLegend), Thy-1.2 (CD90.2)-PerCPCy5.5 (clone 53-2.1; BioLegend), Foxp3-PE (clone 3G3; Miltenyi Biotec; intracellular staining was performed according to the manufacturer's protocol), and CD25-PerCpCy5.5 (clone PC61; BD Pharmingen). The following hybridoma clones were obtained from the American Type Culture Collection or developed in our laboratory, and then the Abs were purified and labeled in our laboratory: CD3-FITC (clone KT3), CD4-Cy3 (clone YTS191.1), CD4-AF647 (clone YTS191.1), CD19-FITC (clone 1D3), and CD45-CF647 (clone IBL-3/16). Measurements were performed on a BD FACSCanto II or a FACSCalibur cytometer.

B cell colony assessment using whole colon bioluminescence

CD19CL transgenic mice (17) crossed with $Nkx2.3^{-/-}$ mice were anesthetized using 50 mg/kg sodium pentobarbital i.p. and were then i.v. injected with 150 mg/kg D-luciferin (Gold Biotechnology) dissolved in sterile PBS (15 mg/ml). Mice were sacrificed 10 min postinjection, and colons were excised and placed on a petri dish and were then immediately transferred into an IVIS Lumina II (PerkinElmer) imaging system with an imaging chamber set to 37°C. Samples were imaged within 15 min postinjection using the following settings: 180 s acquisition, F/stop = 1, and Binning = 4. Data were analyzed using the Living Image software (PerkinElmer). Regions of interest (ROIs) were drawn automatically using identical luminescence signal thresholds. Total radiance, a calibrated unit of the luminescence (total photon flux per second), was calculated in each ROI, and the total number of ROIs (excluding large ROIs with flux $>10^5/s$) per sample was also counted. The ROI area was automatically quantified and expressed as square millimeters.

Bone marrow chimera production

Four-week-old eGFP-TgBALB/c mice (18) were lethally irradiated at the Department of Oncotherapy, University of Pécs, with 2×5.5 Gy administered 6 h apart. Mice received 5×10^6 bone marrow cells in 200 μ l of DMEM via tail veins from either BALB/c or $Nkx2.3^{-/-}$ mice 3 h after the second irradiation. Following reconstitution, mice were provided with ciprofloxacin in drinking water for 2 wk. Chimerism was determined by eGFP/CD45 expression of PBMCs.

Anti-IL-22 treatment

$Nkx2.3^{-/-}$ mice received 2.5% DSS in drinking water for 7 d. Mice were treated with 150 μ g of anti-IL-22 mAb (clone 8E11; Genentech) or isotype control (clone GP120:9709; Genentech) i.p. on days 2, 3, 4, 5, and 6. Weights were measured daily. Mice were sacrificed on day 7, and colons were isolated for histology, flow cytometry, and mRNA. Six mice were used per group, and treatments were performed twice.

Real-time PCR

Total RNA from distal colon homogenates was isolated using NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel). Purity and concentration of RNA were analyzed by NanoDrop. cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA RT Kit (Life Technologies). RT-PCR was run on an ABI-PRISM 7500 machine in duplicates. TaqMan probes (mGAPDH, mIL-17a, mIL-22, mIFN- γ , mRegIII β , mRegIII γ , mMuc2, mTGF- β , mIL-10) were purchased from Life Technologies. Results are shown as percentage of housekeeping gene (mGAPDH).

Statistical analysis

Data analysis was performed using IBM SPSS Statistics software (Version 22). Normality of data distribution was assessed by Shapiro–Wilks test. A *t* test or Mann–Whitney *U* test was employed to compare two groups with normally distributed and non-normally distributed data, respectively. Data are represented as mean \pm SEM. Statistical significance was set at *p* < 0.05.

Results

$Nkx2.3^{-/-}$ mice exhibit impaired colonic ILF maturation

Previous studies in our laboratory and elsewhere indicated a substantial alteration of the vascular architecture and lymphocyte composition of PPs in mice lacking $Nkx2.3$ (7–10). As there are no data on SILT characteristics, we first examined $Nkx2.3$ -deficient mice for the composition of SILT by immunofluorescence analysis of colonic sections. We found that, similarly to PPs, HEVs in colonic patches of $Nkx2.3^{-/-}$ mice lack MAdCAM-1 (Fig. 1a) and display luminal PNAd, in contrast to abluminal PNAd expression in MAdCAM-1⁺ HEVs of BALB/c mice (Fig. 1b).

To determine the effect of the $Nkx2.3$ deficiency on the global distribution of colonic B cell clusters, we crossed $Nkx2.3^{-/-}$ mice with CD19CL transgenic reporter mice (17) with B cell–restricted bioluminescence. Ex vivo measurement of B cell–restricted luciferase activity in whole colon samples revealed a significantly decreased average number of B cell clusters in colons of $Nkx2.3$ -null mutants ($Nkx2.3^{-/-} \times$ mCD19Luc⁺) compared with heterozygous control littermates ($Nkx2.3^{+/-} \times$ mCD19Luc⁺) (Fig. 1c, 1d). However, the average flux (photons per second) of

these regions did not differ between strains, and the average area of regions was significantly higher in $Nkx2.3^{-/-}$ mice compared with heterozygous controls.

To delineate the presence of various SILT components and their maturation stages, multicolor immunofluorescence labeling was employed for Thy-1/CD90, B220, and CR2/CD21 Ags in combination with PNA binding. Using this approach, we identified SILT components at different maturation stages grouped into 1) Thy-1⁺/B220⁻ CPs, 2) Thy-1^{+/+}/B220⁺ immature ILFs, 3) B220⁺/CR2⁺ immature ILFs containing follicular dendritic cells (FDCs), and 4) B220⁺/CR2⁺/PNA⁺ mature ILFs harboring germinal centers, respectively (Fig. 1e, Supplemental Fig. 1A), in both wild-type and $Nkx2.3$ -deficient mice. Staining for the dendritic cell (DC) marker CD11c and the homeostatic chemokine CXCL13 also revealed normal SILT morphology (Supplemental Fig. 1B, 1C). However, the frequency of mature versus immature components showed a shift toward an immature composition (Fig. 1e) in $Nkx2.3^{-/-}$ mice. Thus, the percentage of CPs was $14.4 \pm 2.2\%$ (mean \pm SEM) in BALB/c controls compared with $48.6 \pm 4.2\%$ in $Nkx2.3^{-/-}$ colons. Immature ILFs without FDCs represented $48.2 \pm 4.8\%$ in BALB/c compared with $27.8 \pm 1.2\%$ in $Nkx2.3^{-/-}$ mice. Immature ILFs containing FDCs comprised $28.0 \pm 3.6\%$ compared with $18.3 \pm 3.3\%$ in $Nkx2.3^{-/-}$ colons. Mature, PNA⁺ ILFs constituted $9.4 \pm 2.2\%$ of SILT components in wild-type but only $5.3 \pm 2.2\%$ in the absence of $Nkx2.3$. These results indicate that CPs readily form in the absence of $Nkx2.3$, but their subsequent differentiation into more mature SILT structures is impaired.

To investigate whether this altered SILT ratio is due to the absence of endothelial MAdCAM-1 in $Nkx2.3$ -deficient mice, we also examined SILT components in MAdCAM-1–null mutant mice on C57BL/6 background (16). In MAdCAM-1^{-/-} colonic patches, we found consistently detectable luminal PNAd expression, similar to that observed in $Nkx2.3^{-/-}$ colons (Fig. 1f, 1g). SILT elements with structural similarity to wild-type mice could be identified in MAdCAM-1^{-/-} mice (Supplemental Fig. 1B, 1C). Interestingly, MAdCAM-1^{-/-} mice showed an even greater inhibition of the formation of both immature and mature ILFs (Fig. 1e).

The transition of colonic CPs into mature ILFs is associated with a characteristic exchange of leukocyte subsets, in which adult lymphoid tissue inducer-type (LTi) innate lymphoid cells and CXCL13-producing DCs are replaced by B cells (21). In agreement with our previous findings, flow cytometric analysis of colonic cells confirmed significantly higher numbers of Lin⁻/Thy-1⁺/CD4⁺/ROR γ ⁺ LTi cells (Fig. 1h, 1i) in $Nkx2.3^{-/-}$ mice and increased CD11c⁺ DCs (Fig. 1j) and lower absolute numbers of CD19⁺ B cells (Fig. 1k) in both $Nkx2.3^{-/-}$ and MAdCAM-1^{-/-} mice compared with the respective wild-type controls. The reduction of B cells was more severe in MAdCAM-1^{-/-} than in $Nkx2.3^{-/-}$ mice, indicating again the more profound block in the recruitment of B cells to MAdCAM-1^{-/-} colons. In contrast, both relative and absolute numbers of Th cells were significantly higher in $Nkx2.3$ -deficient mice, whereas in MAdCAM-1^{-/-} mice we noticed a significant increase in the relative Th cell frequencies only (Supplemental Fig. 1D–F). These findings demonstrate that, in the absence of MAdCAM-1, either indirectly (as a consequence of $Nkx2.3$ absence) or directly (in MAdCAM-1^{-/-} mice), the colonic SILT maturation toward ILF is blocked, and the lymphocyte distribution is altered.

$Nkx2.3^{-/-}$ mice are protected from DSS-induced colitis

Colitis induces the transition of CPs to mature ILFs (22, 23). Therefore, we next used the DSS-induced colitis model to examine SILT development under inflammatory conditions. $Nkx2.3$ -deficient mice were given 2.5% DSS in drinking water for 7 d.

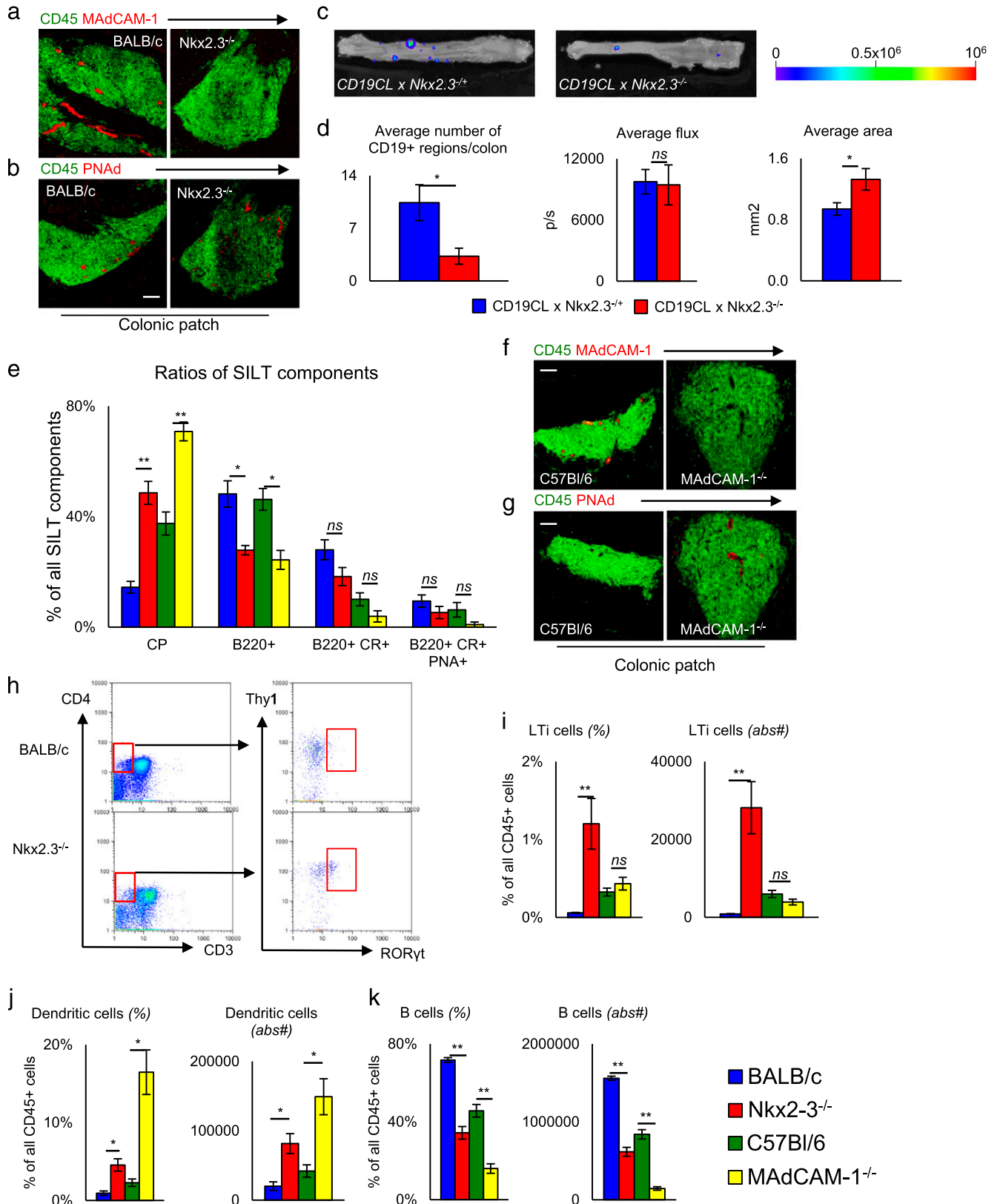


FIGURE 1. Immature SILT phenotype in the absence of Nkx2.3 transcription factor. Sections from BALB/c and Nkx2.3^{-/-} colons were stained for MadCAM-1 (red) and CD45 (green) (**a**), or PNA^d (red) and CD45 (green) (**b**). Immunofluorescence images are representative images of at least five animals. Representative images of whole colons from CD19CL × Nkx2.3^{+/-} and CD19CL × Nkx2.3^{-/-} mice (**c**). Average number, flux, and area of luciferase⁺ B cell regions from CD19CL × Nkx2.3^{+/-} and CD19CL × Nkx2.3^{-/-} colons ($n = 3-5$ animals per group) (**d**). SILT structures of BALB/c, Nkx2.3^{-/-}, C57BL/6, and MAdCAM-1^{-/-} colonic Swiss rolls were counted from four evenly distributed planes with immunofluorescence using Abs against Thy-1, B220, CR1/2, and PNA ($n = 5-7$ animals per genotype) (**e**). Sections from C57BL/6 and MAdCAM-1^{-/-} colons were stained for MadCAM-1 (red) and CD45 (green) (**f**), or PNA^d (red) and CD45 (green) (**g**). Immunofluorescence images are representative images of at least five animals. Representative dot plots of CD3⁺/CD4⁺/RORγt⁺/Thy-1⁺ LTI cells from Nkx2.3^{-/-} and BALB/c colons (**h**). Dot plots are representative of at least five animals. Relative (percentage of CD45⁺ lymphoid cells) and absolute numbers (cells per colon) of LTI cells (**i**), DCs (**j**), and B cells (**k**) from BALB/c, Nkx2.3^{-/-}, C57BL/6, and MAdCAM-1^{-/-} colons ($n = 3-16$). Error bars represent SEM. Scale bars, 250 μm. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. ns, not significant.

Samples were collected on day 7 (acute colitis) and day 14 (subacute colitis). Surprisingly, we found that $Nkx2.3^{-/-}$ mice were protected from DSS-induced colitis based on their physical symptoms compared with controls. Mutant mice lost only minimal weight, macroscopic rectal bleeding was less frequent, the shortening of the colon was minimal, and survival was 100% (Fig. 2a–e). Histological scoring of H&E-stained Swiss roll sections of colons also revealed a significantly lower pathological score both at day 7 and day 14 in $Nkx2.3$ -deficient mutants compared with BALB/c mice (Fig. 2f).

To examine whether the lack of colitis in adult $Nkx2.3$ -deficient mice was related to the absence of endothelial MAdCAM-1, we investigated MAdCAM-1 $^{-/-}$ mice. Interestingly, in contrast to $Nkx2.3^{-/-}$ mice, the generalized absence of MAdCAM-1 did not inhibit the development of intestinal inflammation, as MAdCAM-1 $^{-/-}$ mice exhibited severe colitis comparable to wild-type counterparts (Fig. 2a–f).

In wild-type controls, DSS treatment increased the ratio of mature SILT components containing CR2 $^{+}$ FDCs with or without PNA $^{+}$ germinal centers (Fig. 2g, 2h). However, in $Nkx2.3^{-/-}$ mice we observed a delayed increase of mature components by day 7, although the difference between mutant and wild-type mice was less prominent by day 14 (Fig. 2g). Interestingly, MAdCAM-1-deficient mice exhibited a more profound blockade in SILT maturation, as the ratio of CPs decreased and B cell-containing structures increased only by day 14 after the start of treatment (Fig. 2h). These results on different kinetics of colonic B cell expansion were also supported by flow cytometry. The absolute number of B cells showed a low but significant increase by day 7 of colitis in $Nkx2.3^{-/-}$ mice, whereas DSS-induced colitis in MAdCAM-1 $^{-/-}$ mice led to a significant increase in absolute B cell numbers only by day 14 (Fig. 2i). The absolute B cell numbers were lower in both mutant strains throughout treatments in comparison with the wild-type controls. Furthermore, the absolute number of Th cells was significantly higher in both mutant genotypes than in wild-type mice at day 7. At day 14, $Nkx2.3^{-/-}$ mice displayed similar absolute numbers of Th cells as BALB/c mice, whereas Th cells were still significantly higher in MAdCAM-1-deficient mice (Supplemental Fig. 2B).

Because both $Nkx2.3^{-/-}$ and MAdCAM-1 $^{-/-}$ mice exhibit a similar luminal PNA $^{+}$ expression on colonic vessels but react oppositely to DSS treatment, these results indicate that, although the absence of endothelial MAdCAM-1 may be responsible for the immature status of SILT in both mutants, it does not explain the lack of colitis in $Nkx2.3^{-/-}$ mice.

Lack of Nkx2.3 leads to a skewed accumulation of colonic ROR γ $^{+}$ lymphoid cell and T $_{reg}$ distribution and signature cytokine production

The imbalance between ROR γ $^{+}$ cells (including CD45 $^{+}$ /CD3 $^{+}$ /CD4 $^{+}$ /ROR γ $^{+}$ Th17 cells and CD45 $^{+}$ /CD3 $^{-}$ /ROR γ $^{+}$ ILC3s) and CD3 $^{+}$ /CD4 $^{+}$ /Foxp3 $^{+}$ /CD25 $^{+}$ T $_{regs}$ has been extensively studied in both human IBD and murine models of colitis (24–26). We thus extended our analysis to ROR γ $^{+}$ lymphoid cells and T $_{regs}$. With flow cytometry, we observed a significantly higher frequency and absolute number of ROR γ $^{+}$ Th17 and ILC3 populations (Fig. 3a, 3b, Supplemental Fig. 2C) in the colons of $Nkx2.3^{-/-}$ mice compared with BALB/c controls at all examined time points. Detailed analysis of colonic ILC3 subsets showed significantly higher relative and absolute numbers of CCR6 $^{+}$ /ROR γ $^{+}$ /CD3 $^{-}$ cells in $Nkx2.3$ -deficient mutants, whereas we found a reduced frequency of Nkp46 $^{+}$ /ROR γ $^{+}$ /CD3 $^{-}$ ILC3s compared with wild-type (Fig. 3c). Meanwhile, the frequency and absolute number of CD3 $^{+}$ /CD4 $^{+}$ /Foxp3 $^{+}$ /CD25 $^{+}$ T $_{regs}$ was significantly higher compared with BALB/c mice at day 7 of colitis (Fig. 3d).

We next performed quantitative PCR (qPCR) from colon samples to measure mRNA levels for signature cytokines produced by ILC3s, Th17 cells, and T $_{regs}$. We found that both IFN- γ and IL-17a [characteristic of ILC3 and Th17 (27, 28)] were significantly higher in untreated $Nkx2.3^{-/-}$ mice compared with BALB/c controls (Fig. 3e, 3f). However, treatment of $Nkx2.3^{-/-}$ mice with DSS did not further increase mRNA levels of these cytokines, in contrast to wild-type mice, and at day 14 IFN- γ and IL-17a were significantly higher in BALB/c controls compared with $Nkx2.3^{-/-}$ mutant mice. In contrast, in acute colitis (day 7) we observed significantly elevated IL-22 [characteristic of ILC3 and Th17 and shown to have protective effects in colitis (29, 30)] transcript levels in the absence of $Nkx2.3$ (Fig. 3g). However, during the course of colitis, IL-22 levels were reversed and were higher in wild-type mice than in $Nkx2.3$ -deficient animals at day 14. Meanwhile, mRNA levels for IL-10 (characteristic of T $_{regs}$) were significantly higher in $Nkx2.3^{-/-}$ colons versus BALB/c in untreated controls and at day 7 of DSS treatment, whereas TGF- β 2 was lower in untreated mutant mice and was similar to controls throughout DSS treatment (Fig. 3h, 3i).

To examine whether this altered lymphoid cell composition is due to the endothelial absence of MAdCAM-1, we analyzed MAdCAM-1 $^{-/-}$ mice. DSS treatment increased the relative frequency of ROR γ $^{+}$ Th17 cells and ILC3s at day 7 without affecting the absolute cell number, whereas at day 14 we observed a significantly higher absolute number of these cells compared with wild-type (Supplemental Fig. 2D, 2E). In untreated MAdCAM-1 $^{-/-}$ colons, T $_{reg}$ frequency and absolute number was significantly lower compared with controls, whereas at day 7 we observed a significantly increased frequency but not absolute number of T $_{regs}$ (Supplemental Fig. 2F). In contrast to $Nkx2.3^{-/-}$ mice, IL-22 was not higher in MAdCAM-1-deficient animals compared with controls. IFN- γ was not affected by DSS treatment, and IL-17a increased, although to a smaller extent than in control mice (Supplemental Fig. 2G–I). Untreated MAdCAM-1-deficient colons had significantly higher levels of IL-10, but this difference was absent upon DSS treatment. We observed no difference between MAdCAM-1 $^{-/-}$ mice and C57BL/6 controls in the expression levels of TGF- β 2 (Supplemental Fig. 2J, 2K).

Taken together, these data indicate a shift in the composition of lamina propria lymphocytes, coupled with an altered cytokine production profile in mice lacking $Nkx2.3$, independent of the absence of endothelial MAdCAM-1.

Protection from DSS-induced colitis is independent of increased IL-22 production in Nkx2.3 $^{-/-}$ mice

IL-22 has been shown to have protective effects in colitis by inducing the production of various Reg (regenerating islet-derived protein) family members and mucins important in mucosal healing (29, 30). Accordingly, we found that mRNA levels of RegIII β and RegIII γ were higher in $Nkx2.3^{-/-}$ mice than in wild-type mice. This difference was most prominent in acute colitis (Fig. 4a, 4b). The expression of Muc2, a crucial mucin in the colon (31), was markedly higher in untreated $Nkx2.3^{-/-}$ mice than in wild-type mice but did not differ during acute colitis (Fig. 4c).

IL-22R is also expressed on intestinal stem cells and induces mucosal repair and epithelial cell proliferation upon ligand binding (32, 33). Using EdU staining, we found a significantly higher proliferation rate of colonic epithelial cells in untreated $Nkx2.3^{-/-}$ mice. Treatment with DSS reduced cell proliferation at day 7 in both $Nkx2.3$ mutant and wild-type genotypes; however, the rate of cell proliferation was still significantly higher in $Nkx2.3^{-/-}$ colons (Fig. 4d). Furthermore, whereas in BALB/c mice most EdU $^{+}$ cells localized near the bottom of crypts, in $Nkx2.3$ -deficient large intestines, proliferating cells

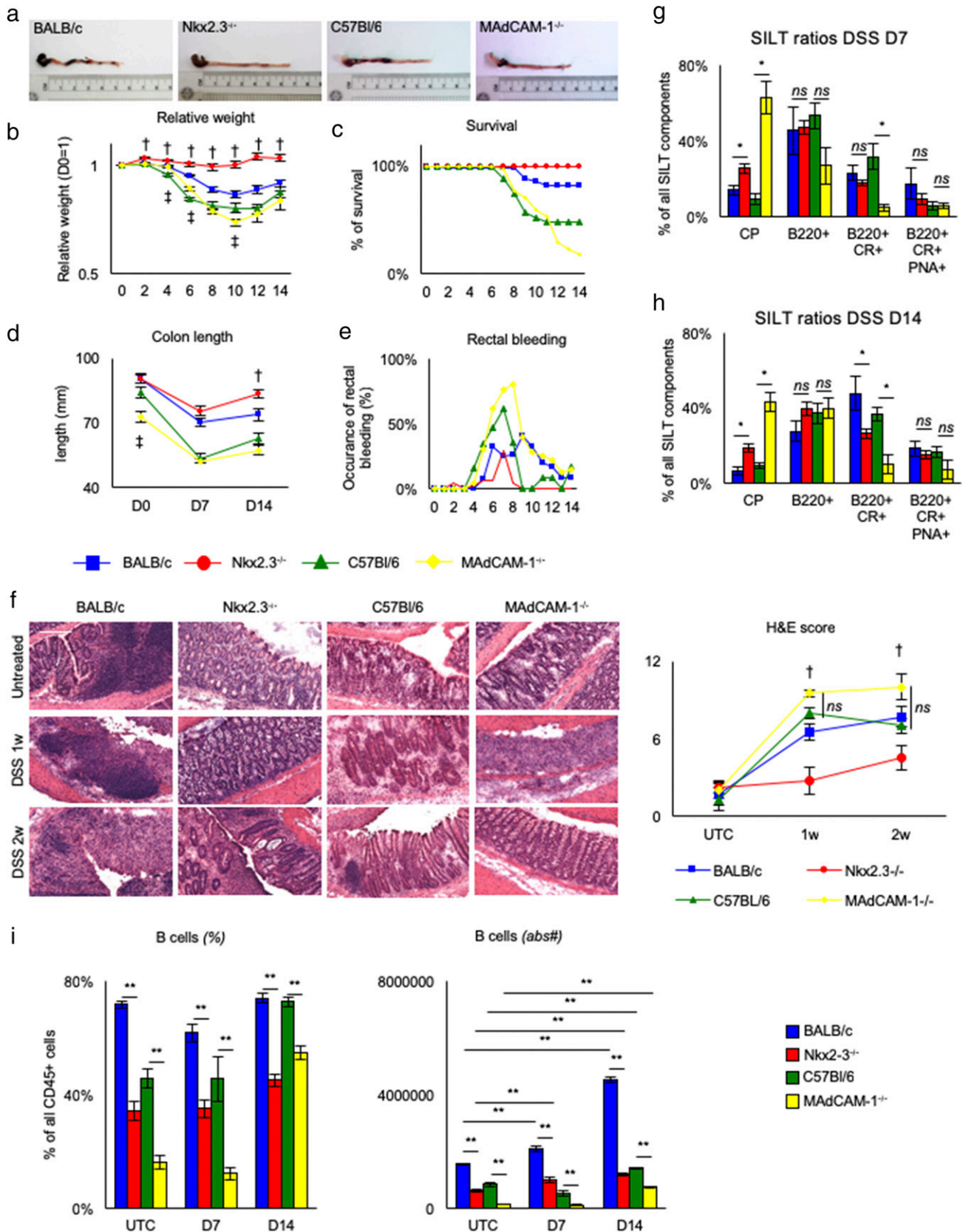


FIGURE 2. Nkx2.3^{-/-} mice do not develop colitis following DSS treatment. Representative colon images (**a**), weight (**b**), survival (**c**), colon length (**d**), and macroscopic rectal bleeding (**e**) of DSS-treated BALB/c, Nkx2.3^{-/-}, C57BL/6, and MAdCAM-1^{-/-} mice ($n > 50$ mice per genotype, with one representative image per genotype; a dagger (†) indicates a significant difference between BALB/c and Nkx2.3^{-/-}; a double dagger (‡) indicates a significant difference between C57BL/6 and MAdCAM-1^{-/-}). H&E stainings and H&E pathology score of BALB/c, Nkx2.3^{-/-}, C57BL/6, and MAdCAM-1^{-/-} colons (stainings are representatives of $n = 3-8$ animals per genotype per group); objective magnification $\times 10$ (**f**). SILT structures of BALB/c and Nkx2.3^{-/-} (**g**) and C57BL/6 and MAdCAM-1^{-/-} (**h**) colonic Swiss rolls were counted from four evenly distributed planes with immunofluorescence using Abs against Thy-1, B220, CR1/2, and PNA ($n = 3-6$ animals per genotype per group). (**i**) Relative (percentage of CD45⁺ lymphoid cells) and absolute number (cells per colon) of colonic B cells from BALB/c, Nkx2.3^{-/-}, C57BL/6, and MAdCAM-1^{-/-} mice ($n = 3-16$ animals/genotype/group). Error bars represent SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. D7, day 7; D14, day 14; ns, not significant; UTC, untreated controls.

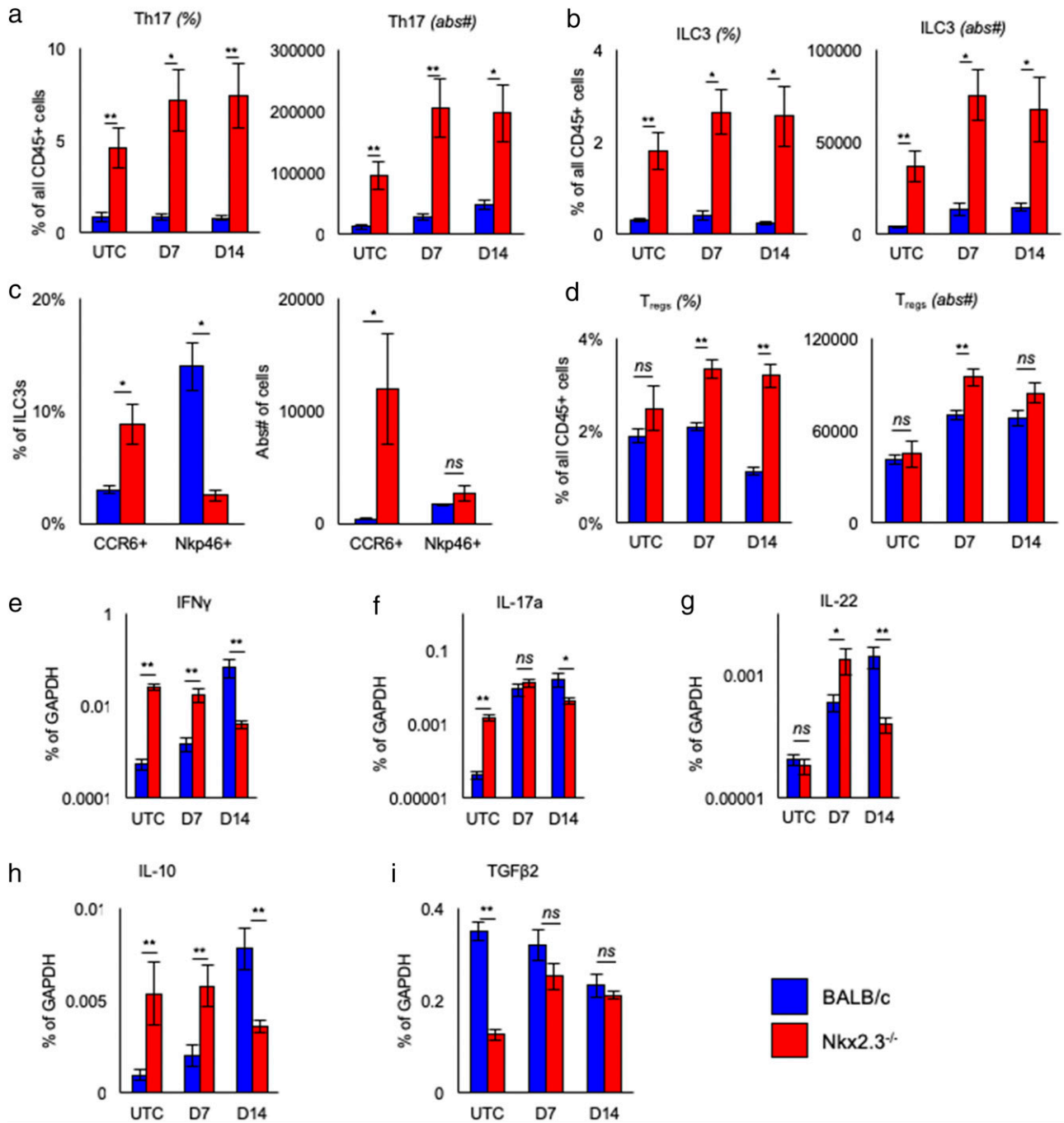


FIGURE 3. Altered colonic lamina propria lymphocyte composition and signature cytokine production in the absence of Nkx2.3. Relative (percentage of CD45⁺ lymphoid cells) and absolute numbers (cells per colon) of Th17 cells (a) and ILC3s (b) from BALB/c and Nkx2.3^{-/-} colons (n = 3–9 animals per genotype per group). Relative (percentage of ILC3) and absolute numbers (cells per colon) of CCR6⁺ and Nkp46⁺ ILC3s in BALB/c and Nkx2.3^{-/-} colons (n = 3–9 animals per genotype) (c). Relative (percentage of CD45⁺ lymphoid cells) and absolute numbers (cells per colon) of T_{regs} from BALB/c and Nkx2.3^{-/-} colons (n = 5–7 animals per genotype per group) (d). Real-time qPCR results from cDNA for IFN-γ (e), IL-17a (f), IL-22 (g), IL-10 (h), and TGF-β2 (i) from BALB/c and Nkx2.3^{-/-} distal colons (n = 5–10 animals per genotype per group). Error bars represent SEM. *p < 0.05, **p < 0.005. D7, day 7; D14, day 14; ns, not significant; UTC, untreated controls.

were visible along the whole length of crypts (Fig. 4e). As intestinal epithelial cell turnover is also influenced by cell death, we next analyzed cell apoptosis. In accordance with previously published data (11), we observed no difference in the number of TUNEL⁺ colonic epithelial cells per crypt between Nkx2.3^{-/-} and BALB/c mice (Supplemental Fig. 3A). However, DSS treatment led to a significantly lower number of apoptotic cells in Nkx2.3^{-/-} colons compared with BALB/c controls.

To investigate whether the increased IL-22 mRNA is responsible for protection from colitis in Nkx2.3^{-/-} mice, we first measured

IL-22 serum protein levels. Although we found no differences in untreated mice, serum IL-22 was significantly lower in DSS-treated mice compared with wild-type controls (Supplemental Fig. 3B). To further rule out the possibility that IL-22 elevated locally has a role in preventing colonic inflammation in the absence of Nkx2.3, Nkx2.3^{-/-} mice received antagonistic anti-IL-22 Ab or isotype control during the course of a 7-d DSS treatment. Surprisingly, we observed no differences in colitis symptoms (Fig. 4f, Supplemental Fig. 3C–E) during treatment. Histological scoring of inflammation severity and SILT spectrum

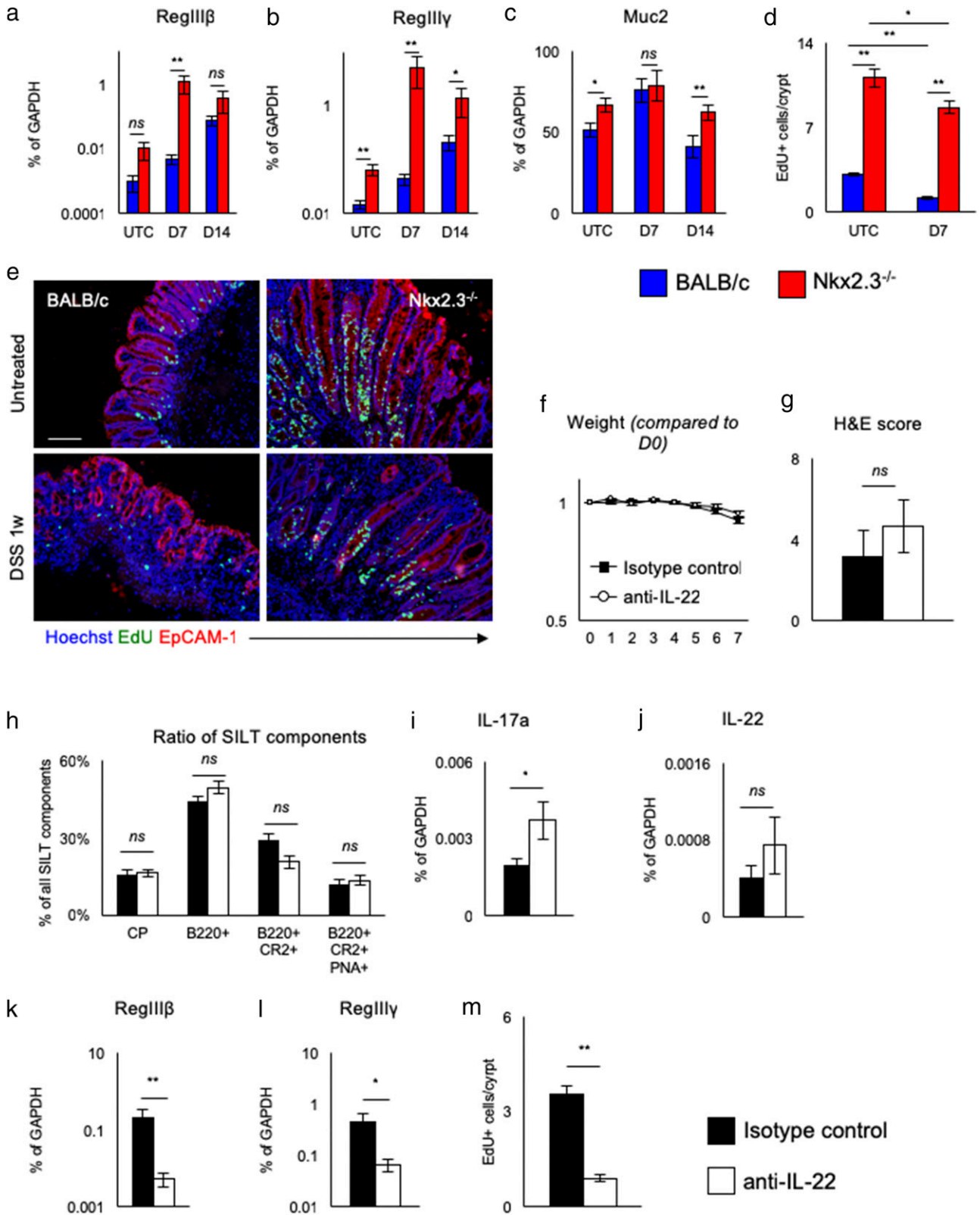


FIGURE 4. Higher levels of IL-22 do not explain protection from colitis. Real-time qPCR results from cDNA for RegIII β (**a**), RegIII γ (**b**), and Muc2 (**c**) from BALB/c and Nkx2.3^{-/-} distal colons ($n = 5-10$ animals per genotype per group). Number of EdU⁺ cells per colonic crypt in BALB/c and Nkx2.3^{-/-} mice ($n = 5$ animals per genotype per group) (**d**). Representative immunofluorescence images of colonic epithelial cell proliferation measured 4 h after injecting EdU i.p. using EpCAM (red), Hoechst nuclear stain (blue), and EdU (green); scale bar, 250 μ m (**e**). Weight (**f**), H&E score (**g**), SILT ratios (**h**), real-time qPCR results from distal colonic cDNA for IL-17a (**i**), IL-22 (**j**), RegIII β (**k**), RegIII γ (**l**), and number of EdU⁺ cells per colonic crypt (**m**) of DSS-treated Nkx2.3^{-/-} mice receiving anti-IL-22 or isotype control mAbs ($n = 12$ mice per group). Error bars represent SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. D7, day 7; D14, day 14; ns, not significant; UTC, untreated controls.

evaluation in Swiss roll sections of colons also revealed no difference (Fig. 4g, 4h). Both absolute and relative Th17 and ILC3 did not differ statistically between groups (Supplemental Fig. 3F, 3G). Furthermore, mRNA for IL-17a (Fig. 4i) was significantly higher in anti-IL-22 treated mice, whereas IFN- γ (Supplemental Fig. 3H) and IL-22 (Fig. 4j) were not. mRNA for RegIII β and RegIII γ was significantly lower in anti-IL-22 treated mice (Fig. 4k, 4l), indicating an efficient blockade by the anti-IL-22 Ab. We also observed a significantly lower proliferation rate of colonic epithelial cells in Nkx2.3^{-/-} mice receiving anti-IL-22 mAb (Fig. 4m).

These results indicate that blocking IL-22 protein does not induce colitis in Nkx2.3^{-/-} mice, although it results in reduced expression of Reg family members involved in mucosal healing.

Protection against colitis in mice lacking Nkx2.3 is mediated by nonhematopoietic cells

To better determine whether the altered cytokine profile in Nkx2.3^{-/-} mice was a lymphoid cell-intrinsic effect or was

caused by Nkx2.3-deficient stromal cells interacting with lymphocytes, we created bone marrow chimeras. Four-week-old eGFP-Tg-BALB/c mice were lethally irradiated and reconstituted with either Nkx2.3^{-/-} or BALB/c bone marrow. Five weeks after transplantation, chimeric mice (with over 90% chimerism based on the absence of eGFP in CD45⁺ peripheral blood leukocytes) received 2.5% DSS in drinking water for 7 d and were then sacrificed. Weight loss was not different between the two groups (Fig. 5a), and also other parameters of colitis were similar (Fig. 5b–d, Supplemental Fig. 4A–L). These results indicate that the lack of Nkx2.3 in hematopoietic cells fails to influence the course of colitis, suggesting that the protection in Nkx2.3^{-/-} mice is due to the absence of this transcription factor in colonic stromal cells.

To identify Nkx2.3-expressing nonhematopoietic cells within the colon, we next used LacZ-Nkx2.3^{+/-} reporter mice (8). Using immunohistochemistry combined with X-gal staining, we found that Nkx2.3 is not expressed in epithelial cells or endothelial cells (Fig. 5e, 5f). However, nuclear LacZ signal was observed in cells with a myofibroblast-like morphology

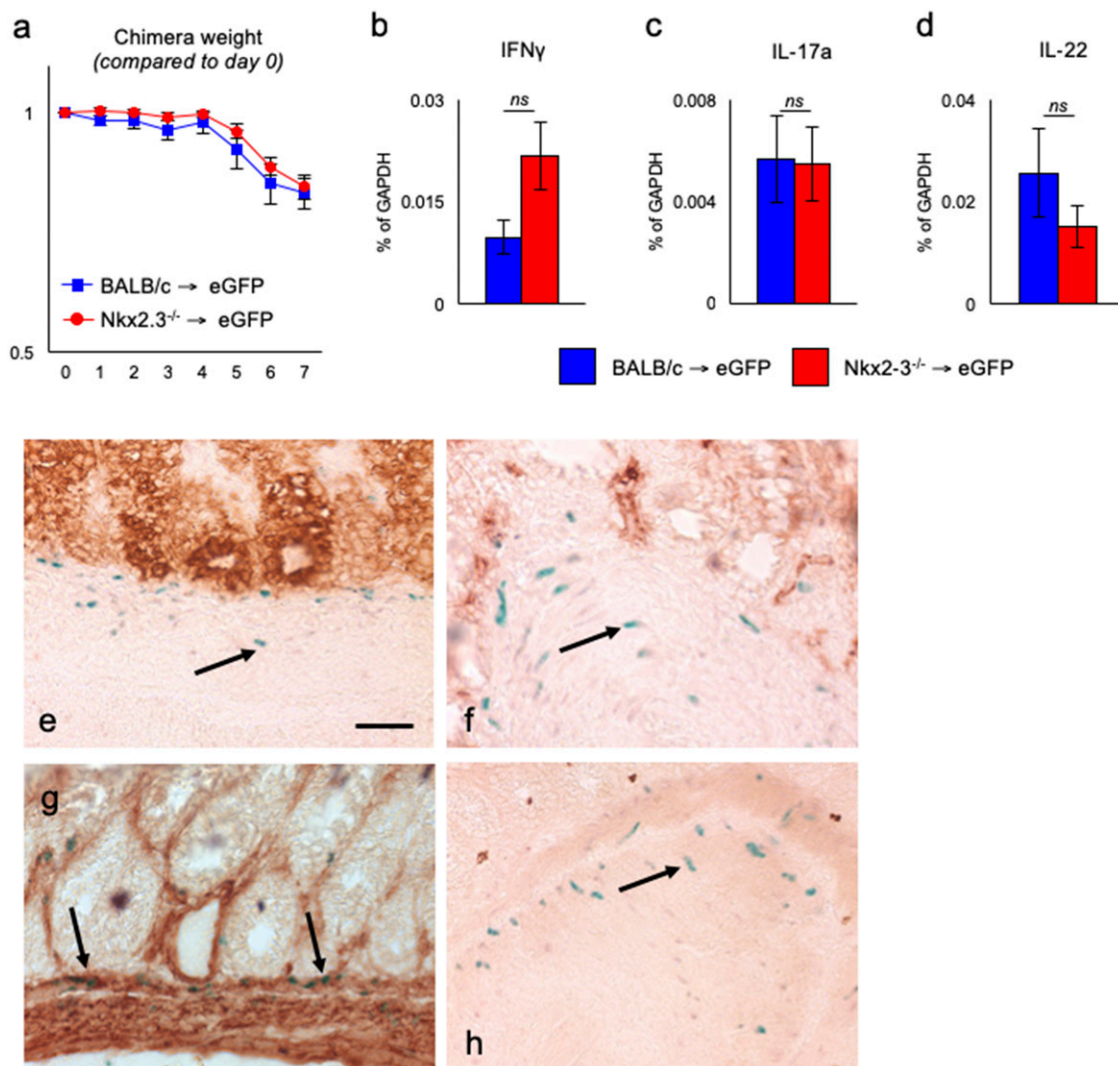


FIGURE 5. Nkx2.3 deficiency in nonhematopoietic colonic cells attenuates colitis. Weights of BALB/c → eGFP and Nkx2.3^{-/-} → eGFP bone marrow chimeras that had received 2.5% DSS for 7 d ($n = 5$ animals per genotype) (a). Real-time qPCR results from cDNA for IFN- γ (b), IL-17a (c), and IL-22 (d) from distal colons from BALB/c → eGFP and Nkx2.3^{-/-} → eGFP bone marrow chimeras ($n = 5$ animals per genotype). Representative images of immunohistochemical staining of colons from LacZ-Nkx2.3^{+/-} reporter mice with anti-EpCAM (e), IBL-20 (f), anti-VAP-1 (g), or isotype control Abs (h) ($n = 5$ mice). Error bars represent SEM. Arrows point to LacZ⁺ nuclei expressing Nkx2.3. Objective magnification $\times 20$. ns, not significant.

and VAP-1 expression mainly in the tunica muscularis mucosae of gut wall (Fig. 5g), in line with recently published human data (34).

Discussion

IBDs are often associated with lymphoid neogenesis resulting in the formation of intestinal tertiary lymphoid tissues, a process that significantly recapitulates secondary lymphoid organ development (1). Hematopoietic cells important in lymphoid tissue development and the pathogenesis of colitis include the heterogeneous group of ROR γ ⁺ ILC3s playing diverse roles in response to epithelial damage and the subsequent modulation of SILT organization (35). Intestinal ILC3 migration is mediated by α 4 β 7 integrin, the counter receptor for endothelial MAdCAM-1 (36).

The homeodomain transcription factor Nkx2.3 has been implicated in both IBD pathogenesis and the formation of intestinal lymphoid tissues. It was first described as a tissue-specific morphogenic factor promoting murine spleen and PP development (7). Nkx2.3 was found to be expressed throughout the intestine starting from embryonic day 9 (8). Expression was most prominent in the ileum and localized mainly to smooth muscle and endothelial cells of the intestine and the pancreas, but it was also present in the colonic lamina propria in adult mice. Nkx2.3^{-/-} mice showed delayed intestinal development coupled with malabsorption (11). Importantly, the development of PPs was also impaired, including the absence of MAdCAM-1 expression on HEVs (7, 8), replaced by PNAd in adult mice (10). In humans, Nkx2.3 was linked to both CD and ulcerative colitis. Because of single nucleotide polymorphisms in its coding region, it may act as a shared susceptibility factor for both types of IBD (12, 13). Recent findings in human samples indicate that Nkx2.3 possibly serves to maintain myofibroblast identity in pericryptal stem cell niches of colorectal mucosa in a complex interaction also involving VAP-1 and TGF- β (34). Interestingly, no data have been available on the effect of Nkx2.3 on the development of intestinal tertiary lymphoid structures and the inducibility of colitis, prompting our investigation of a chemically induced colitis model in mice lacking Nkx2.3.

Our observations in Nkx2.3^{-/-} mice revealed the impaired capacity of colonic LP to promote the maturation of ILFs, resulting in the accumulation of immature stages of SILT. These results are in line with previous work emphasizing the role of endothelial MAdCAM-1- α 4 β 7 interactions in the transition of CPs to ILFs (5) and were comparable to the phenotype of MAdCAM-1-deficient mice. The lack of detectable Nkx2.3 in mature normal B cells also points to stromal factors responsible for impaired follicle maturation in these mutants (37).

Upon treatment with DSS, SILT components in Nkx2.3^{-/-} mice show a gradual shift toward the mature state observed in wild-type. However, these mice did not develop colitis. Importantly, these observations are in striking contrast with our findings in MAdCAM-1^{-/-} mice presenting with severe colitis but only marginal maturation of CPs, despite the similar SILT appearance without treatment. The profound difference in the two mutant strains, both deficient for endothelial MAdCAM-1, suggests that the lack of colitis in Nkx2.3-deficient mice is not mediated by the absence of MAdCAM-1. Although the SILT maturation in C57BL/6 mice is delayed compared with BALB/c during the postnatal period (38), the age of mice used had passed this period. As, by this stage in Nkx2.3-knockout mice, endothelial MAdCAM-1 expression is already extinguished, yet upon DSS treatment Nkx2.3-deficient mice react in a drastically different way than *Madcam1*^{-/-} mice, we conclude that the differences in

SILT development and response to DSS treatment are not linked to the absence of endothelial MAdCAM-1, per se.

Importantly, we found no difference upon DSS treatment of irradiated wild-type mice reconstituted with either wild-type or Nkx2.3^{-/-} bone marrow, emphasizing Nkx2.3's stroma-associated function. Despite our repeated attempts using a large cohort of mice, we did not succeed in creating chimeras using Nkx2.3-deficient mice, as all Nkx2.3^{-/-} recipients exposed to the same dose of radiation needed for myeloablation in BALB/c recipients died shortly after transplantation of bone marrow from syngeneic BALB/c donors. We attribute this failure to the atrophic red pulp (8, 9) with insufficient support capacity during the early period of the hematopoietic reconstitution. Therefore, Nkx2.3-knockout mice are clearly radiosensitive, and the replacement of wild-type hematopoietic cells with Nkx2.3-deficient leukocytes in wild-type recipients did not reduce the inducibility of colitis. This does not rule out the survival of radioresistant host-derived hematopoietic cells, including innate lymphoid cells; however, testing for GFP expression in lamina propria ILC3 cells in reconstituted GFP⁺ BALB/c recipients, we found high-level (at least 80–90%) GFP⁻ donor representation (shown on Supplemental Fig. 4H–J). Furthermore, previous studies showed no detectable expression of Nkx2.3 mRNA in hematopoietic cells (8, 11), thus, even if there are radioresistant hematopoietic cells, they are not directly influenced by Nkx2.3 but rather by their microenvironment.

Protection in Nkx2.3-mutant mice was coupled with significantly higher absolute numbers of ROR γ ⁺ cells and increased mRNA expression levels of IL-22, leading to previously reported protective consequences (29–31). These findings are similar to those observed in DSS-treated Ret^{MEN2B} mice with more ILC3s producing IL-22 but not IL-17a (39). However, the lack of inflammation upon administration of the antagonistic anti-IL-22 mAb in Nkx2.3^{-/-} mice indicates that the protection from colitis is independent of IL-22. Considering the significance of neural regulation of ILC3s (39), possible alterations of the enteric nervous system in Nkx2.3 deficiency may also contribute to the protection from colitis, perhaps involving other Nkx family members such as Nkx2.1 (also known as Thyroid Transcription Factor-1, *TTF1*), linked to RET mutations and Hirschsprung disease (40).

These observations lead us to hypothesize that under homeostatic conditions the absence of endothelial MAdCAM-1 explains the immature SILT phenotype observed in both Nkx2.3^{-/-} and MAdCAM-1^{-/-} mice. However, the significant differences between the two mutant strains during DSS treatment indicate that the absence of MAdCAM-1 on its own is an unlikely cause for these alterations. Instead, we suggest that upon epithelial damage, stromal cells lacking Nkx2.3 create an IL-22-independent protective microenvironment, leading to enhanced mucosal healing. The exact identity, phenotype, and function of these Nkx2.3-dependent cells and their interactions with lymphoid cells remain to be elucidated; however, their precise identification and regulatory pathways influenced by Nkx2.3 may offer potential therapeutic targets. As, in both humans and wild-type mice, Nkx2.3 expression is detectable primarily within the muscle layer underneath the lamina propria (8, 34) (Fig. 5g), the augmented epithelial regeneration in Nkx2.3 mutants may be linked to effects exerted in myofibroblasts influencing intestinal stem cell homeostasis via Wnt signaling (41, 42).

Our work also highlights the ambiguous role of MAdCAM-1- α 4 β 7 interactions in the induction of colitis. Although β 7 integrin contributes to colitis, as demonstrated in a T cell-dependent CD45RB T cell transfer model (43) and in the T cell-independent

DSS model (44), our findings reveal that the absence of MAdCAM-1 does not necessarily protect from DSS-induced colitis. Considering the differences in the onset of DSS-induced colitis, a detailed investigation of intestinal stroma and the exploration of Nkx2.3 functions within stromal cells clearly warrant further studies. Finding the mechanisms of how either lymphoid and/or epithelial cells are influenced by Nkx2.3⁺ stromal cells may have therapeutic implications in IBD and other chronic inflammatory conditions.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to Dr. Eugene Butcher (Stanford University) and Dr. Sirpa Jalkanen (University of Turku, Turku, Finland) for providing the anti-PNAd-Dylight594 mAb and the VAP-1 mAb, respectively, and the Department of Oncotherapy, University of Pécs, for performing mouse irradiation. The authors gratefully acknowledge the generous donation of the anti-IL-22 (clone 8E11) and isotype control (clone GP120:9709) by Genentech, Inc. LacZ-Nkx2.3^{+/−} colonic samples were kindly provided by Dr. Cheng-Chun Wang (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore). The authors acknowledge the technical assistance of Gabriella Tuboly-Vincze.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Buettner, M., and M. Lochner. 2016. Development and function of secondary and tertiary lymphoid organs in the small intestine and the colon. *Front. Immunol.* 7: 342.
- Kanamori, Y., K. Ishimaru, M. Nanno, K. Maki, K. Ikuta, H. Nariuchi, and H. Ishikawa. 1996. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thy1+ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J. Exp. Med.* 184: 1449–1459.
- Kiss, E. A., C. Vonarbourg, S. Kopfmann, E. Hobeika, D. Finke, C. Esser, and A. Diefenbach. 2011. Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science* 334: 1561–1565.
- Boukora, D., C. Brézillon, M. Bérard, C. Werts, R. Varona, I. G. Boneca, and G. Eberl. 2008. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456: 507–510.
- Wang, C., J. S. McDonough, K. G. McDonald, C. Huang, and R. D. Newberry. 2008. Alpha4beta7/MAdCAM-1 interactions play an essential role in transitioning cryptopatches into isolated lymphoid follicles and a nonessential role in cryptopatch formation. *J. Immunol.* 181: 4052–4061.
- Knoop, K. A., B. R. Butler, N. Kumar, R. D. Newberry, and I. R. Williams. 2011. Distinct developmental requirements for isolated lymphoid follicle formation in the small and large intestine: RANKL is essential only in the small intestine. *Am. J. Pathol.* 179: 1861–1871.
- Pabst, O., R. Förster, M. Lipp, H. Engel, and H. H. Arnold. 2000. NKX2.3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen and mucosa-associated lymphoid tissue. *EMBO J.* 19: 2015–2023.
- Wang, C. C., C. Biben, L. Robb, F. Nassir, L. Barnett, N. O. Davidson, F. Koentgen, D. Tarlinton, and R. P. Harvey. 2000. Homeodomain factor Nkx2-3 controls regional expression of leukocyte homing coreceptor MAdCAM-1 in specialized endothelial cells of the viscera. *Dev. Biol.* 224: 152–167.
- Czömpöly, T., A. Lábadi, Z. Kellermayer, K. Olasz, H. H. Arnold, and P. Balogh. 2011. Transcription factor Nkx2-3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen. *J. Immunol.* 186: 6981–6989.
- Kellermayer, Z., M. Mihalj, Á. Lábadi, T. Czömpöly, M. Lee, E. O'Hara, E. C. Butcher, G. Berta, A. Balogh, H. H. Arnold, and P. Balogh. 2014. Absence of Nkx2-3 homeodomain transcription factor reprograms the endothelial addressin preference for lymphocyte homing in Peyer's patches. *J. Immunol.* 193: 5284–5293.
- Pabst, O., R. Zweigert, and H. H. Arnold. 1999. Targeted disruption of the homeobox transcription factor Nkx2-3 in mice results in postnatal lethality and abnormal development of small intestine and spleen. *Development* 126: 2215–2225.
- Parkes, M., J. C. Barrett, N. J. Prescott, M. Tremelling, C. A. Anderson, S. A. Fisher, R. G. Roberts, E. R. Nimmo, F. R. Cummings, D. Soars, et al; Wellcome Trust Case Control Consortium. 2007. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* 39: 830–832.
- Fisher, S. A., M. Tremelling, C. A. Anderson, R. Gwilliam, S. Bumpstead, N. J. Prescott, E. R. Nimmo, D. Massey, C. Berzuini, C. Johnson, et al; Wellcome Trust Case Control Consortium. 2008. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat. Genet.* 40: 710–712.
- Yu, W., J. P. Hegarty, A. Berg, A. A. Kelly, Y. Wang, L. S. Poritz, A. Franke, S. Schreiber, W. A. Koltun, and Z. Lin. 2012. PTPN2 is associated with Crohn's disease and its expression is regulated by NKX2-3. *Dis. Markers* 32: 83–91.
- Yu, W., J. P. Hegarty, A. Berg, X. Chen, G. West, A. A. Kelly, Y. Wang, L. S. Poritz, W. A. Koltun, and Z. Lin. 2011. NKX2-3 transcriptional regulation of endothelin-1 and VEGF signaling in human intestinal microvascular endothelial cells. *PLoS One* 6: e20454.
- Schippers, A., C. Leuker, O. Pabst, A. Kochut, B. Prochnow, A. D. Gruber, E. Leung, G. W. Krissansen, N. Wagner, and W. Müller. 2009. Mucosal addressin cell-adhesion molecule-1 controls plasma-cell migration and function in the small intestine of mice. *Gastroenterology* 137: 924–933.
- Scotto, L., M. Kruithof-de Julio, L. Paoluzzi, M. Kalac, E. Marchi, B. J. Butrago, J. Amengual, M. M. Shen, and O. A. O'Connor. 2012. Development and characterization of a novel CD19CherryLuciferase (CD19CL) transgenic mouse for the preclinical study of B-cell lymphomas. *Clin. Cancer Res.* 18: 3803–3811.
- Kvell, K., T. Czömpöly, L. Hiripi, P. Balogh, J. Kóbor, L. Bodrogi, J. E. Pongrácz, W. A. Ritchie, and Z. Bosze. 2010. Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis. *Transgenic Res.* 19: 105–112.
- Barthel, M., S. Hapfelmeier, L. Quintanilla-Martínez, M. Kremer, M. Rohde, M. Hogardt, K. Pfeffer, H. Rüssmann, and W. D. Hardt. 2003. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect. Immun.* 71: 2839–2858.
- Sawa, S., M. Lochner, N. Satoh-Takayama, S. Dulauroy, M. Bérard, M. Kleinschek, D. Cua, J. P. Di Santo, and G. Eberl. 2011. RORγt+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat. Immunol.* 12: 320–326.
- McDonald, K. G., J. S. McDonough, B. K. Dieckgraefe, and R. D. Newberry. 2010. Dendritic cells produce CXCL13 and participate in the development of murine small intestine lymphoid tissues. *Am. J. Pathol.* 176: 2367–2377.
- Lochner, M., C. Ohnmacht, L. Presley, P. Bruhns, M. Si-Tahar, S. Sawa, and G. Eberl. 2011. Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of RORγt and LTi cells. *J. Exp. Med.* 208: 125–134.
- Olivier, B. J., C. Cailotto, J. van der Vliet, M. Knippenberg, M. J. Greuter, F. W. Hilbers, T. Konijn, A. A. Te Velde, M. A. Nolte, G. E. Boeckxstaens, et al. 2016. Vagal innervation is required for the formation of tertiary lymphoid tissue in colitis. *Eur. J. Immunol.* 46: 2467–2480.
- Ito, R., M. Kita, M. Shin-Ya, T. Kishida, A. Urano, R. Takada, J. Sakagami, J. Imanishi, Y. Iwakura, T. Okanoue, et al. 2008. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 12–16.
- Geremia, A., C. V. Arancibia-Carcamo, M. P. Fleming, N. Rust, B. Singh, N. J. Mortensen, S. P. Travis, and F. Powrie. 2011. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* 208: 1127–1133.
- Boden, E. K., and S. B. Snapper. 2008. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24: 733–741.
- Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, and L. A. Fouser. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203: 2271–2279.
- Takatori, H., Y. Kanno, W. T. Watford, C. M. Tato, G. Weiss, I. I. Ivanov, II, D. R. Littman, and J. J. O'Shea. 2009. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J. Exp. Med.* 206: 35–41.
- Zheng, Y., P. A. Valdez, D. M. Danilenko, Y. Hu, S. M. Sa, Q. Gong, A. R. Abbas, Z. Modrusan, N. Ghilardi, F. J. de Sauvage, and W. Ouyang. 2008. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* 14: 282–289.
- Pickert, G., C. Neufert, M. Leppkes, Y. Zheng, N. Wittkopf, M. Warntjen, H. A. Lehr, S. Hirth, B. Weigmann, S. Wirtz, et al. 2009. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* 206: 1465–1472.
- Van der Sluis, M., B. A. De Koning, A. C. De Bruijn, A. Velcich, J. P. Meijerink, J. B. Van Goudoever, H. A. Büller, J. Dekker, I. Van Seuningen, I. B. Renes, and A. W. Einerhand. 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131: 117–129.
- Aparicio-Domingo, P., M. Romera-Hernandez, J. J. Karrich, F. Cornelissen, N. Papazian, D. J. Lindenbergh-Kortleve, J. A. Butler, L. Boon, M. C. Coles, J. N. Samsom, and T. Cupedo. 2015. Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage. *J. Exp. Med.* 212: 1783–1791.
- Lindemans, C. A., M. Calafiore, A. M. Mertelsmann, M. H. O'Connor, J. A. Dudakov, R. R. Jenq, E. Velardi, L. F. Young, O. M. Smith, G. Lawrence, et al. 2015. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* 528: 560–564.
- Hsia, L. T., N. Ashley, D. Ouaret, L. M. Wang, J. Wilding, and W. F. Bodmer. 2016. Myofibroblasts are distinguished from activated skin fibroblasts by the expression of AOC3 and other associated markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: E2162–E2171.
- Klose, C. S., and D. Artis. 2016. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* 17: 765–774.
- Kim, M. H., E. J. Taparowsky, and C. H. Kim. 2015. Retinoic acid differentially regulates the migration of innate lymphoid cell subsets to the gut. *Immunity* 43: 107–119.
- Robles, E. F., M. Mena-Varas, L. Barrio, S. V. Merino-Cortes, P. Balogh, M. Q. Du, T. Akasaka, A. Parker, S. Roa, C. Panizo, et al. 2016. Homeobox

- NKX2-3 promotes marginal-zone lymphomagenesis by activating B-cell receptor signalling and shaping lymphocyte dynamics. *Nat. Commun.* 7: 11889.
38. Pabst, O., H. Herbrand, T. Worbs, M. Friedrichsen, S. Yan, M. W. Hoffmann, H. Körner, G. Bernhardt, R. Pabst, and R. Förster. 2005. Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 35: 98–107.
 39. Ibiza, S., B. García-Cassani, H. Ribeiro, T. Carvalho, L. Almeida, R. Marques, A. M. Mistic, C. Bartow-McKenney, D. M. Larson, W. J. Pavan, et al. 2016. Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* 535: 440–443.
 40. Garcia-Barceló, M. M., D. K. Lau, E. S. Ngan, T. Y. Leon, T. T. Liu, M. T. So, X. P. Miao, V. C. Lui, K. K. Wong, R. W. Ganster, et al. 2007. Evaluation of the thyroid transcription factor-1 gene (TITF1) as a Hirschsprung's disease locus. *Ann. Hum. Genet.* 71: 746–754.
 41. Yu, W., Z. Lin, J. P. Hegarty, G. John, X. Chen, P. W. Faber, A. A. Kelly, Y. Wang, L. S. Poritz, S. Schreiber, and W. A. Koltun. 2010. Genes regulated by Nkx2-3 in siRNA-mediated knockdown B cells: implication of endothelin-1 in inflammatory bowel disease. *Mol. Genet. Metab.* 100: 88–95.
 42. Perochon, J., L. R. Carroll, and J. B. Cordero. 2018. Wnt signalling in intestinal stem cells: lessons from mice and flies. *Genes (Basel)* 9: 138.
 43. Sydora, B. C., N. Wagner, J. Lohler, G. Yakoub, M. Kronenberg, W. Muller, and R. Aranda. 2002. beta7 integrin expression is not required for the localization of T cells to the intestine and colitis pathogenesis. *Clin. Exp. Immunol.* 129: 35–42.
 44. Schippers, A., M. Muschaweck, T. Clahsen, S. Taurat, L. Grieb, K. Tenbrock, N. Gaßler, and N. Wagner. 2016. β 7-integrin exacerbates experimental DSS-induced colitis in mice by directing inflammatory monocytes into the colon. *Mucosal Immunol.* 9: 527–538.

Nkx2-3—A Slippery Slope From Development Through Inflammation Toward Hematopoietic Malignancies

Dóra Vojkovic^{1,2}, Zoltán Kellermayer^{1,2}, Béla Kajtár³,
Giovanna Roncador⁴, Áron Vincze⁵ and Péter Balogh^{1,2}

¹Department of Immunology and Biotechnology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary. ²Lymphoid Organogenesis Research Group, Szentágotthai János Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary. ³Department of Pathology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary. ⁴Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain. ⁵1st Department of Internal Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary.

Biomarker Insights
Volume 13: 1–6
© The Author(s) 2018
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1177271918757480



ABSTRACT: The development of peripheral lymphoid tissues from the mesoderm is the result of a complex convergence combining lymphohematopoietic differentiation with the local specification of nonhematopoietic mesenchymal components. Although the various transcriptional regulators with fate-determining effects in diversifying the mobile leukocyte subsets have been thoroughly studied and identified, the tissue-specific determinants promoting the regional differentiation of resident mesenchyme are less understood. Of these factors, various members of the NK-class Nkx paralogues have emerged as key regulators for the organogenesis of spleen and mucosal lymphoid tissues, and recent data have also indicated their involvement in various pathological events, including gut inflammation and hematopoietic malignancies. Here, we summarize available data on the roles of Nkx2-3 in lymphoid tissue development and discuss its possible value as a developmental marker and disease-associated pathogenic trait.

KEYWORDS: Nkx2-3, lymphoid organs, lymphoma, inflammation

RECEIVED: October 28, 2017. **ACCEPTED:** January 10, 2018.

TYPE: Review

FUNDING: The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Z.K. is supported by the UNKP-17-4-I New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities and the postdoctoral research grant of the Faculty of Medicine, University of Pécs. This work was supported by OTKA K108429, GINOP-232-15-2016-00050, and EFOP-361-16-2016-00004 research funds.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS: The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

CORRESPONDING AUTHOR: Péter Balogh, Department of Immunology and Biotechnology, Medical School, University of Pécs, H-7624 Pécs, Szigeti út 12, Pécs 7624, Hungary. Email: balogh.peter@pte.hu

Introduction: Roles of Nkx Family Members in Cellular Differentiation and Organogenesis—A General Overview

The development of complex organisms such as the mammalian body requires a highly regulated coordination of gene expression. Homeobox genes containing helix-turn-helix DNA-binding motif first described in *Drosophila* are master regulators of developmental processes such as mesodermal patterning. The largest group of homeobox genes comprises the HOX (including the extended HOX) class of transcription factors, which may be phylogenetically related to the NK class of homeobox genes that constitutes the second largest group of homeobox-encoding genes. In *Drosophila*, there are 2 classes of NK genes, the NK-1 class containing the NK-1 family and the NK-2 class with the highly related NK-2, NK-3, and NK-4 families. Two NK-2 class genes, namely, *tinman* and *bagpipe*, are responsible for dorsal heart tube formation, mesodermal differentiation, and development of gut musculature, respectively.¹ Vertebrate homologues of ancient NK-class homeobox containing genes were identified on their conserved tyrosine residues.^{2,3}

All NK-2 members are responsible for the development of a certain organ or tissue, and most of them share an overlapping expression pattern. They are able to activate signaling pathways responsible for cell differentiation, migration, and maturation, thus their activity is essential to the formation

and maintenance of a normally structured and functioning organism.⁴

Regulation through Nkx transcription factors encoded by NK-2 genes is a well-balanced system, where every small change can lead to severe alterations. This complexity is well illustrated by the multiple roles of the NK-2 class members. Nkx2.1 and Nkx2.8 are responsible for lung epithelial development and surfactant production, whereas Nkx2.1 is also crucial in the development of thyroid and pituitary glands.⁵ Alterations in the *Nkx2.1* gene can cause neurological defects, congenital hypothyroidism, and lung malformations in humans.⁶ In addition, *Nkx2.1* also acts as a proto-oncogene in lung tumors,⁷ and it is overexpressed in lung adenocarcinoma and small cell lung cancer.⁸ Due to its tissue specificity, it can be used for the identification of metastatic cells of lung epithelial origin.⁹ Furthermore, Nkx2.1 and Nkx2.8 also have a prognostic value, as their upregulation in human lung squamous carcinoma cells resulted in resistance to cisplatin, a chemotherapeutic agent.^{10,11}

Nkx2.2 and Nkx2.9 share an overlapping expression pattern in neural progenitors. They are necessary for the development of spinal cord V3 interneurons and hindbrain visceral motor neurons, as the spinal cords of mice lacking these factors have



reduced number of V3 neurons and expanded motor neurons.¹²

Another important factor is *Nkx2.5*, an early myogenic marker detected in mouse embryos from embryonic day 7.5 (E7.5), which is responsible for the development of the atrio-ventricular node and the myocardium. *Nkx2.5* is responsible for cardiac looping and the expression of several other transcription factors essential for heart development, angiogenesis, and hematopoiesis, thus its mutation causes an arrest in heart development and embryonic lethality in mice.^{13,14} In humans, mutations of *Nkx2.5*, such as a single-nucleotide deletion that was correlated with congenital heart disease, can cause atrial septal defect and sudden cardiac death.¹⁵ Furthermore, *Nkx2.6* has a similar role in heart development; however, its role is less important because *Nkx2.6* null mice are viable due to the compensatory effect of *Nkx2.5*. This compensation is probably related to the ectopic expression of *Nkx2.5* in the lateral pharynx where normally only *Nkx2.6* is expressed.¹⁶

Besides the nervous system, the vascular system and airways, combinatorial expression of *Nkx* factors can also be observed in abdominal visceral organs, especially in the stomach (*Nkx2.5* and *Nkx2.6*) and spleen (*Nkx2.5* and *Nkx2.3*).

Although the various *NK-2* homologues have different sequences reflecting different functions, they display overlapping homeodomain structure and DNA-sequence specificities as defined by its first helical region and carboxy-terminal region and often overlapping expression patterns. In contrast to most of the *NK* class members which bind DNA with TAAT core sequences,^{17,18} homeoproteins of the *NK-2* class bind DNA with CAAG core sequences.^{19,20} The specific overlapping or distinct expression and DNA-binding specificities of these *Nkx* factors create a special transcriptional setting, which is essential in development, differentiation, and adult tissue patterning in an organ-specific manner, collectively referred to as “*Nkx* code.”²¹

Roles of *Nkx* Family Members in the Formation of Lymphoid Tissues and Intestinal Inflammation

Nkx family members also play crucial roles in lymphoid organ development. The spleen, the largest peripheral lymphoid organ, develops following signals originating from the splanchnic mesodermal plate (SMP) during embryonic development,²¹ a transient structure expressing *Nkx3-2* (also known as *Bapx1*). The *Nkx3-2*-producing SMP has an essential role in the formation of left-right asymmetry²¹ and the development of spleen from E10-10.5. The absence of this factor causes asplenia and disturbed pyloric sphincter formation due to impairments of the visceral mesoderm. As SMP formation is permitted in the absence of *Nkx3-2*, it is likely that this factor is not necessary for the appearance of SMP but is required for its maturation to provide further factors promoting spleen development.

Another *Nkx* member, *Nkx2-5*, is also expressed in the developing spleen and its absence also leads to asplenia.²² Both *Nkx3-2* and *Nkx2-5* can serve as early markers of splenic

development. *Nkx2-5* is expressed in specified splenic mesenchymal cells which will form the splenic anlage.²³ Among these mesenchymal cells, we can find lymphoid tissue organizer cells that serve as stromal precursors of secondary lymphoid organs.²⁴ According to Castagnaro et al, all splenic stromal cells (fibroblastic reticular cells, marginal reticular cells, follicular dendritic cells [FDCs], and mural cells) derived from *Nkx2-5*⁺*Islet1*⁺*IL-7*⁺ mesenchymal precursors. Interestingly, this derivation is spleen specific, as *Nkx2-5* is not involved in the stromal development of mesenteric lymph nodes and Peyer's patches.²⁵

In contrast to *Nkx2-5* and *Nkx3-2* which take part only in spleen development among peripheral lymphoid organs, *Nkx2-3* is involved in the formation of other lymphoid tissues as well. *Nkx2-3* is expressed in the spleen, midgut, hindgut, and pharyngeal endoderm.²⁶ *Nkx2-3* is crucial for the formation of visceral mesoderm which gives rise to several cell types, such as vascular and intestinal smooth muscle cells, endothelial cells involved in leukocyte traffic, and stromal cells of secondary lymphoid organs.²³ The main effect of *Nkx2-3* is the expression of the mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in endothelial cells. MAdCAM-1 has a crucial role in lymphocyte homing to mucosal tissues by binding integrin $\alpha 4\beta 7$ and L-selectin leukocyte homing receptors.²⁷

Nkx2-3 deficiency in mice results in atrophic disorganized spleen, fewer and smaller Peyer's patches with altered endothelial addressin expression, enlarged and disorganized colonic crypts, abnormal villus formation, and altered lymphocyte homing.²⁸ In the spleen, the possible target cells affected by *Nkx2-3* deficiency are the red pulp (RP) sinus endothelial cells, as in mice lacking *Nkx2-3*, the venous sinus network identifiable by IBL-9/2 rat mAb²⁹ is completely missing. The absence of *Nkx2-3* also disrupts the architecture of marginal sinus, including the organization of marginal zone (MZ) macrophage subpopulations and MAdCAM-1-positive marginal sinus-lining endothelial cells, similar to the deficiency of lymphotoxin β receptor (LT β R); however, the RP vasculature is unperturbed in the absence of LT β R.³⁰ In human spleen, the presence of RP venous sinuses lined by CD31⁺/CD34⁻/vWF⁺ endothelial cells that express *Nkx2-3* supports the involvement of *Nkx2-3* in the regional specification of endothelium.³¹ Furthermore, the absence of *Nkx2-3* in mice causes ectopic differentiation of splenic vessels into lymph node like high endothelial venules (HEVs) displaying PNA⁺ homing addressin in an LT β R-dependent process.³² Similarly, the constitutive activation of the noncanonical nuclear factor κ B pathway mediating LT β R signaling in *p100*^{-/-}/*p52* knock-in mice also resulted in ectopic PNA⁺ positive splenic HEVs; however, these endothelial cells coexpressed both MAdCAM-1 and PNA⁺,³³ whereas the HEVs in adult *Nkx2-3*-deficient mice only produced PNA⁺ addressin.³² Interestingly, *Nkx2-3* may also affect the vascular commitment of spleen at a very early stage, as its absence also induced the expression of sac-like structures within the spleen lined by endothelial cells

displaying LYVE-1 hyaluronan receptor, characteristic for lymphatic endothelia.³⁴ In summary, although some features of the absence of *Nkx2-3* are reminiscent of the consequences of $LT\beta R$ inactivation, the “gradient” of splenic tissue alterations manifests in an opposite directionality—in *Nkx2-3*^{-/-} mice, the most severe splenic defect affects the RP, with somewhat lesser defects of white pulp and follicles (including preserved FDCs), whereas in *Ltbr*^{-/-} mice, the RP appears intact, but the white pulp and follicles (lacking FDCs) are severely perturbed. The MZ is affected in both conditions. Furthermore, the formation of Peyer’s patches in *Nkx2-3*-deficient mice is partially blocked,³⁵ and in the mucosal HEVs, the MAdCAM-1 addressin is also replaced by PNA.³⁶

Microvascular endothelial cells are important mediators of intestinal homeostasis and inflammation. Activation of this endothelial layer by bacterial and other agents results in the upregulation of adhesion molecules and chemokines necessary for the vascular attachment and migration of leukocytes. Altered expression of endothelial markers such as *Nkx2-3* and its potential target MAdCAM-1 can cause a perturbation in leukocyte traffic and inflammatory response. Consequently, the development of inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn disease (CD) and ulcerative colitis (UC) can be linked to these endothelial factors.^{37,38} In the past few years, several genome-wide association studies have demonstrated an association between altered expression of *Nkx2-3* and IBDs. According to Xiao et al, single-nucleotide polymorphisms of *Nkx2-3* (namely, rs10883365 and rs1190140) are associated with CD and UC. Polymorphism rs10883365 may contribute significantly to the emergence of both CD and UC, whereas occurrence of the T allele of rs1190140 can increase the risk of CD.³⁹

Increased expression of *Nkx2-3* at both RNA and protein level was also demonstrated in intestinal samples of patients with CD.³⁸ Connor et al⁴⁰ reported that elevated *Nkx2-3* level may lead to the upregulation of MAdCAM-1 at inflammatory sites. Tumor necrosis factor α can further augment adhesion molecule expression in the intestines and it may crossregulate the genes affected by *Nkx2-3*.³⁸

In other studies, 125 *Nkx2-3*-regulated genes were identified in an *Nkx2-3* knockdown B-cell line using genome-wide gene expression microarray analysis. This cell line was originated from a patient with CD and showed downregulation of 33 and upregulation of 92 genes following *Nkx2-3* knockdown.⁴¹ In this study, a comprehensive list of inflammation-associated genes and their subpathways that are regulated by *Nkx2-3* was also provided. According to these findings, *Nkx2-3* knockdown caused downregulation of CXCR7 and upregulation of CXCL1, CCL22, and CXCL10 chemokines, hence affecting the chemotactic activities in immune responses.⁴¹ Decreased *Nkx2-3* levels also influenced the MEF2/KLF2 pathway, which has an important role in the maintenance of microvascular endothelial balance and induction of inflammation.⁴²

However, KLF2 also regulates the vasoactive peptide endothelin-1 (END-1), which may have role in the development of IBD. END-1 expression negatively correlates with *Nkx2-3* as it was downregulated in the intestinal tissue of patients with UC and CD.³⁸

Recently, a positive feedback loop in the expression of AOC3 (amine oxidase, copper containing 3, a marker expressed on cell surface, thus enabling sorting of viable cells) and *Nkx2-3* was observed both in human myofibroblast cell lines and primary cultures as colorectal epithelial stem cell niche components. Intriguingly, *Nkx2-3* expression not only distinguished intestinal myofibroblasts from skin fibroblasts but it also turned out to be a determinant in the preservation of myofibroblast identity, presumably involved in regulating colonic stem cell niche.⁴³ This was further proven using small interfering RNA-mediated knockdown of *Nkx2-3* in myofibroblast lines, inducing cells to acquire a fibroblast-like genetic profile. The exact connection between the *Nkx2.3*⁺ myofibroblasts and the recently discovered CD34⁺ gp38⁺ nonmyofibroblastic mesenchymal cells that create a niche for intestinal epithelial stem cells⁴⁴ remains to be elucidated.

The lineage-specific expression of *Nkx2-3* has not been formally defined yet either in humans or in mice. Using a recently developed and validated immunohistochemistry-grade anti-human *Nkx2-3* mAb^{31,45} may in the future enable a conclusive assessment to be achieved, even though its expression is probably shared by several mesenchymal cells in a regionally restricted manner of the colonic subepithelial connective tissue (Figure 1).

Involvement of *Nkx2-3* in Hematopoietic Malignancies

In addition to exerting important functions in the vascular specification of spleen and Peyer’s patches, recently, *Nkx2-3* has also been implicated in lymphocyte differentiation. Although lack of *Nkx2-3* blocks the development of splenic MZ B cells probably through an altered microenvironment,³⁵ a recent study showed that the B-cell-restricted overexpression of *Nkx2-3* due to the translocation of *NKX2-3* gene to the Ig heavy chain (*IgH*) causes splenic MZ lymphoma. This juxtaposition of 14q32.33 (*IgH*) and 10q24.2 (*NKX2-3*) was identified by break point cloning analysis of B-cell lymphoma samples.⁴⁵ In a transgenic (Tg) mouse model using a similar translocation, an oligoclonal expansion occurs first as a result of increased B-cell receptor signaling and enhanced adhesiveness through several adhesion molecules, including LFA-1 integrin, ICAM-1, and MAdCAM-1 adhesion molecules. This condition later evolves into a nongermlinal center-type diffuse large B-cell lymphoma (non-GC DLBCL) similar to human mucosa-associated lymphoid tissue and MZ lymphomas. Interestingly, despite the presence of the translocation, the lymphoma usually occurred at a slow pace, beyond 1 year of age in Tg mice. In a large cohort of B-cell malignancies,

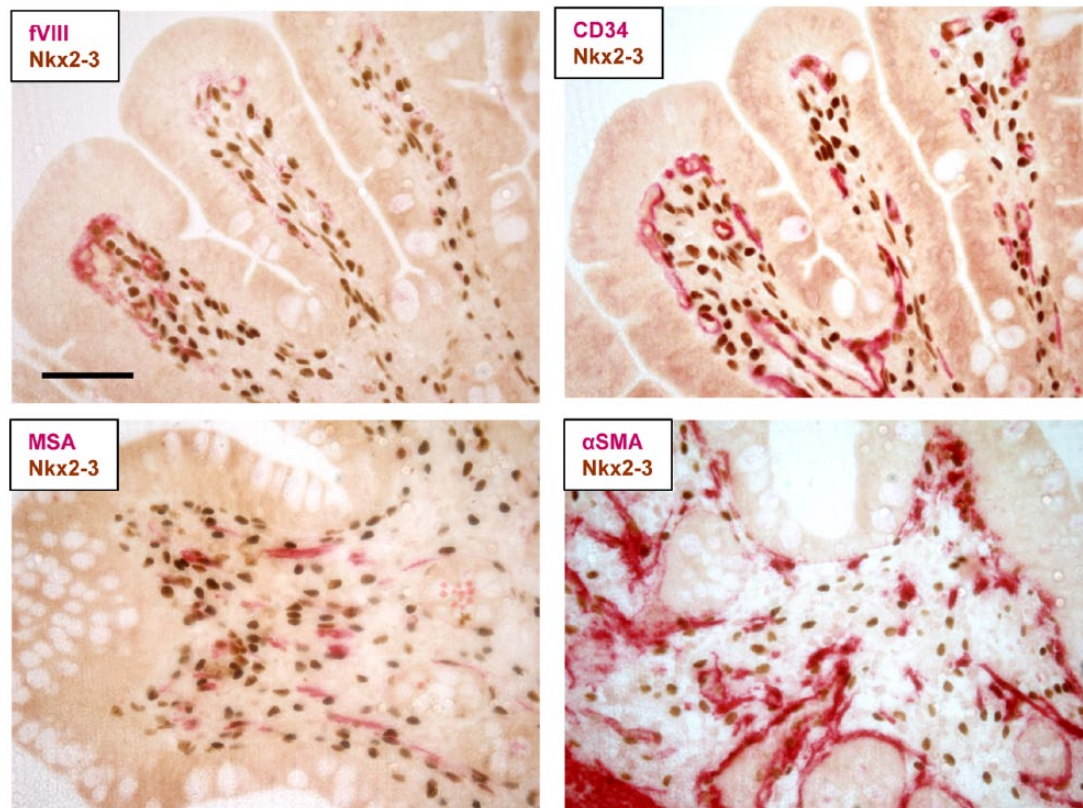


Figure 1. Immunohistochemical localization of Nkx2-3 protein expression in human colon in formaldehyde-fixed paraffin-embedded (FFPE) biopsy. Using reference labeling (in red color) for endothelial markers (factor VIII [upper left] or CD34 [upper right]) or myofibroblast-smooth muscle markers (muscle-specific actin, MSA [lower left] or alpha-smooth muscle actin, α SMA [lower right]) in dual immunohistochemistry reveals both shared expression and partial overlap with Nkx2-3–positive cells (brown nuclear staining). Scale bar, 100 μ m.

increased Nkx2-3 expression was detected in 3% of the samples, with higher frequency (6%–7%) in splenic MZ lymphomas and MALT lymphomas, corresponding to the regional expression of Nkx2-3; however, in other forms of B-cell lymphomas without such regional confinement (DLBCL, follicular lymphoma, mantle cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, or multiple myeloma), upregulated Nkx2-3 was found in less than 1% of the cases.⁴⁵ It remains to be seen whether the expression of Nkx2-3 may reflect differences either in the clinical course (including regional involvement) or in therapeutic responses within homogeneous groups of various B-cell malignancies.

Regarding various precursor B-cell alterations induced by Nkx2-3 deviations, the absence of Nkx2-3 in mice caused no marked alteration in the bone marrow B-cell lineage composition.³⁵ However, in a type of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) characterized by ETV6/RUNX1 positivity, Nkx2-3 may also be involved. This fusion is created through a t(12;21) (p13;q22) translocation of ETS variant 6 and Run-related transcription factor-1 (RUNX1). A recent study investigated ETV6/RUNX1–positive B-cell precursor-ALL (BCP-ALL)–associated long-coding (lnc) messenger RNA (mRNA) expression patterns, and they identified 16 lnc mRNAs associated with ETV6/RUNX1 in BCP-ALL samples. They also described binding of a histone modification H3K27ac—a

regulatory enhancer element—with the ETV6/RUNX1–specific lnc mRNAs such as lnc-NKX2-3-1 in REH cells. Short hairpin RNA silencing of the fusion protein has also confirmed that lnc-NKX2-3-1 and other 3 lnc mRNAs are regulated by ETV6/RUNX1. Although most of these lnc mRNAs have an effect on the translational level, lnc-NKX2-3 and lnc-RTN4R-1 rather act transcriptionally and cause significant alterations of gene expression.^{46–48}

In addition to BCP malignancies, Nkx2-3 among other members of NK-like (NKL) homeobox proteins has recently also been involved in T-cell ALL (T-ALL). In cases with blocked *T-cell receptor α -chain* rearrangement, the maturation arrest in a subset of T-ALL was associated with ectopic expression of Nkx2-3 or other members of NKL factors, causing rearrangement inhibition through the repression of *TcR α* enhancer (E α).⁴⁹

The potential involvement of other Nkx members in T-ALL was previously established, which also demonstrated a connection between TAL1, miR-17-92, and leukemic transformation. *Nkx3-1* may, in a tissue-specific manner, act as tumor suppressor in prostate epithelium⁵⁰ but its promoter is a target for TAL1-mediated activation and consequent transformation in T-cell precursors. As downstream target, miR-17-92 is also involved in cell cycle regulation through E2F1 and Notch1-induced T-ALL, although the exact relationship

Table 1. Effects of Nkx mutations on lymphoid organ formation and hematopoietic malignancies.

NKX FAMILY MEMBER	SPLEEN	PEYER'S PATCHES	ASSOCIATION WITH HEMATOPOIETIC MALIGNANCIES
Nkx2.1 (TFF-1)	—	—	Rearrangement in T-cell acute lymphoblastic leukemia ⁵⁴
Nkx2.2	—	—	Rearrangement in T-cell acute lymphoblastic leukemia ⁵⁴
Nkx2.3	Smaller, atrophic red pulp, disorganized stroma, lymph node like vasculature, defect in B-cell maturation ²⁸	Fewer, smaller, with altered vascular MAdCAM-1/PNAd switch, abnormal lymphocyte homing ²⁸	Ectopic expression maturation arrest in T-ALL ⁴⁹ Involvement in ETV6/RUNX1-positive B-ALL ⁴⁶ IgH-related translocation in MZBL ⁴⁵
Nkx2.5	Asplenia ⁵⁵	No contribution ²⁵	Translocation to BCL11B in T-ALL ⁵²
Nkx3.1 (BAPX2)	—	—	Induces proliferation in TAL1-positive human T-ALL ⁵⁰ Ectopic expression in T-ALL cell lines ⁵³
Nkx3.2 (BAPX1)	Asplenia/hyposplenia ²² Perturbation of LR asymmetry ²¹	—	Ectopic expression in T-ALL cell lines ⁵³

Abbreviations: B-ALL, B-cell acute lymphoblastic leukemia; IgH, Ig heavy chain; LR, left-right; MZBL, marginal zone B-cell lymphoma; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia.

between these participants is not fully determined.⁵¹ In addition, human pediatric T-ALL has also been associated with *Nkx2-5* translocated to either *BCL11B* or *TcR δ* ,^{52,53} indicating that although in normal T-cell maturation these NK genes play no demonstrable role, they possess transformation potential on ectopic expression.

Conclusions and Perspectives

According to available data, *Nkx2-3* and its paralogues exert essential functions in normal developmental patterning and differentiation of several peripheral lymphoid organs and may play role(s) in hematopoietic/lymphoid malignancies. Although the normal physiological tissue maturation proceeds in a spatially and temporally defined order under the influence of Nkx family members, the involvement of ectopic *Nkx2-3* expression in malignant transformation appears to be a random event, coupled with diverse cellular signaling alterations. The most widely established consequence of the deregulated expression of *Nkx2-3* is closely linked to IBD, and as this condition represents a possible precursor for colonic cancer, monitoring the tissue expression of *Nkx2-3* protein may entail further diagnostic importance (Table 1).

Author Contributions

The review's concept was conceived and the manuscript was written by PB, DV and ZK; immunohistochemistry for *Nkx2-3* was contributed by GR and BK; human tissue biopsy samples were provided by ÁV.

REFERENCES

- Stanfel MN, Moses KA, Schwartz RJ, Zimmer WE. Regulation of organ development by the NKX-homeodomain factors: an NKX code. *Cell Molec Biol (Noisy-le-grand)*. 2005 Suppl 51:OL785–99.
- Hayashi S, Scott MP. What determines the specificity of action of Drosophila homeodomain proteins? *Cell*. 1990;63:883–894.
- Jagla K, Bellard M, Frasch M. A cluster of Drosophila homeobox genes involved in mesoderm differentiation programs. *Bioessays*. 2001;23:125–133.
- Hombria JC, Lovegrove B. Beyond homeosis—HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation*. 2003;71:461–476.
- Kimura S, Hara Y, Pineau T, et al. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev*. 1996;10:60–69.
- Safi KH, Bernat JA, Keegan CE, Ahmad A, Hershenson MB, Arteta M. Interstitial lung disease of infancy caused by a new NKX2-1 mutation. *Clin Case Rep*. 2017;5:739–743.
- Weir BA, Woo MS, Getz G, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2007;450:893–898.
- Yang L, Lin M, Ruan WJ, et al. Nkx2-1: a novel tumor biomarker of lung cancer. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2012;13:855–866.
- Stenhouse G, Fyfe N, King G, Chapman A, Kerr KM. Thyroid transcription factor 1 in pulmonary adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2004;57:383–387.
- Zhang P, Han Y, Huang L, Li Q, Ma D. Expression and clinical significance of TTF-1 and p63 in NSCLC. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi/Chinese J Lung Cancer*. 2009;12:995–999.
- Hsu DS, Acharya CR, Balakumaran BS, et al. Characterizing the developmental pathways TTF-1, NKX2-8, and PAX9 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:5312–5317.
- Briscoe J, Sussel L, Serup P, et al. Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded sonic hedgehog signalling. *Nature*. 1999;398:622–627.
- Lyons I, Parsons LM, Hartley L, et al. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev*. 1995;9:1654–1666.
- Tanaka M, Chen Z, Bartunkova S, Yamasaki N, Izumo S. The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development*. 1999;126:1269–1280.
- Ellesoe SG, Johansen MM, Bjerre JV, Hjortdal VE, Brunak S, Larsen LA. Familial atrial septal defect and sudden cardiac death: identification of a novel NKX2-5 mutation and a review of the literature. *Congen Heart Dis*. 2016;11:283–290.
- Tanaka M, Yamasaki N, Izumo S. Phenotypic characterization of the murine Nkx2.6 homeobox gene by gene targeting. *Molec Cell Biol*. 2000;20:2874–2879.
- Mennerich D, Hoffmann S, Hadrys T, Arnold HH, Bober E. Two highly related homeodomain proteins, Nkx5-1 and Nkx5-2, display different DNA binding specificities. *Biol Chem*. 1999;380:1041–1048.
- Jorgensen MC, Petersen HV, Ericson J, Madsen OD, Serup P. Cloning and DNA-binding properties of the rat pancreatic beta-cell-specific factor Nkx6.1. *FEBS Lett*. 1999;461:287–294.
- Guazzi S, Price M, De Felice M, Damante G, Mattei MG, Di Lauro R. Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J*. 1990;9:3631–3639.

20. Chen CY, Schwartz RJ. Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, nkx-2.5. *J Biol Chem.* 1995;270:15628–15633.
21. Hecksher-Sorensen J, Watson RP, Lettice LA, et al. The splanchnic mesodermal plate directs spleen and pancreatic laterality, and is regulated by bapx1/Nkx3.2. *Development.* 2004;131:4665–4675.
22. Lettice LA, Purdie LA, Carlson GJ, Kilanowski F, Dorin J, Hill RE. The mouse bagpipe gene controls development of axial skeleton, skull, and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:9695–9700.
23. Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN. Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays.* 2007;29:166–177.
24. Katakai T, Suto H, Sugai M, et al. Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J Immunol.* 2008;181:6189–6200.
25. Castagnaro L, Lenti E, Maruzzelli S, et al. Nkx2-5(+)/islet1(+) mesenchymal precursors generate distinct spleen stromal cell subsets and participate in restoring stromal network integrity. *Immunity.* 2013;38:782–791.
26. Pabst O, Schneider A, Brand T, Arnold HH. The mouse Nkx2-3 homeodomain gene is expressed in gut mesenchyme during pre- and postnatal mouse development. *Dev Dynamics.* 1997;209:29–35.
27. Mebius RE, Streeter PR, Michie S, Butcher EC, Weissman IL. A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4+ CD3- cells to colonize lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:11019–11024.
28. Pabst O, Zweigerdt R, Arnold HH. Targeted disruption of the homeobox transcription factor Nkx2-3 in mice results in postnatal lethality and abnormal development of small intestine and spleen. *Development.* 1999;126:2215–2225.
29. Balazs M, Horvath G, Grama L, Balogh P. Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. *Cell Immunol.* 2001;212:126–137.
30. Balogh P, Balazs M, Czompoly T, Weih DS, Arnold HH, Weih F. Distinct roles of lymphotoxin-beta signaling and the homeodomain transcription factor Nkx2.3 in the ontogeny of endothelial compartments in spleen. *Cell Tissue Res.* 2007;328:473–486.
31. Kellermayer Z, Hayasaka H, Kajtar B, et al. Divergence of vascular specification in visceral lymphoid organs—genetic determinants and differentiation checkpoints. *Int Rev Immunol.* 2016;35:489–502.
32. Czompoly T, Labadi A, Kellermayer Z, Olasz K, Arnold HH, Balogh P. Transcription factor Nkx2-3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen. *J Immunol.* 2011;186:6981–6989.
33. Guo F, Weih D, Meier E, Weih F. Constitutive alternative NF-kappaB signaling promotes marginal zone B-cell development but disrupts the marginal sinus and induces HEV-like structures in the spleen. *Blood.* 2007;110:2381–2389.
34. Kellermayer Z, Labadi A, Czompoly T, Arnold HH, Balogh P. Absence of Nkx2-3 homeodomain transcription factor induces the formation of IYVE-1-positive endothelial cysts without lymphatic commitment in the spleen. *J Histochem Cytochem.* 2011;59:690–700.
35. Pabst O, Forster R, Lipp M, Engel H, Arnold HH. NKX2.3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen and mucosa-associated lymphoid tissue. *EMBO J.* 2000;19:2015–2023.
36. Kellermayer Z, Mihajl M, Labadi A, et al. Absence of Nkx2-3 homeodomain transcription factor reprograms the endothelial addressin preference for lymphocyte homing in Peyer's patches. *J Immunol.* 2014;193:5284–5293.
37. Hatoum OA, Binion DG. The vasculature and inflammatory bowel disease: contribution to pathogenesis and clinical pathology. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:304–313.
38. Yu W, Lin Z, Kelly AA, et al. Association of a Nkx2-3 polymorphism with Crohn's disease and expression of Nkx2-3 is up-regulated in B cell lines and intestinal tissues with Crohn's disease. *J Crohn Colitis.* 2009;3:189–195.
39. Lu X, Tang L, Li K, et al. Contribution of NKX2-3 polymorphisms to inflammatory Bowel diseases: a meta-analysis of 35358 subjects. *Sci Rep.* 2014;4:3924.
40. Connor EM, Eppihimer MJ, Morise Z, Granger DN, Grisham MB. Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation. *J Leuko Biol.* 1999;65:349–355.
41. Yu W, Lin Z, Hegarty JP, et al. Genes regulated by Nkx2-3 in siRNA-mediated knockdown B cells: implication of endothelin-1 in inflammatory bowel disease. *Molec Genet Metab.* 2010;100:88–95.
42. SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, et al. KLF2 is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med.* 2004;199:1305–1315.
43. Hsia LT, Ashley N, Ouaret D, Wang LM, Wilding J, Bodmer WF. Myofibroblasts are distinguished from activated skin fibroblasts by the expression of AOC3 and other associated markers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:E2162–E2171.
44. Stzpourginski I, Nigro G, Jacob JM, et al. CD34+ mesenchymal cells are a major component of the intestinal stem cells niche at homeostasis and after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:E506–E513.
45. Robles EF, Mena-Varas M, Barrio L, et al. Homeobox NKX2-3 promotes marginal-zone lymphomagenesis by activating B-cell receptor signalling and shaping lymphocyte dynamics. *Nat Comm.* 2016;7:11889.
46. Ghazavi F, De Moerloose B, Van Loocke W, et al. Unique long non-coding RNA expression signature in ϵ TV6/RUNX1-driven B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2016;7:73769–73780.
47. Kuster L, Grausenburger R, Fuka G, et al. ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. *Blood.* 2011;117:2658–2667.
48. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK medical research council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:429–438.
49. Villarese P, Lours C, Trinquand A, et al. TCR α rearrangements identify a subgroup of NKL-deregulated adult t-ALLs associated with favorable outcome. *Leukemia.* 2017;32:61–71.
50. Shen MM, Abate-Shen C. Roles of the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Dev Dynamics.* 2003;228:767–778.
51. Kusy S, Gerby B, Goardon N, et al. NKX3.1 is a direct TAL1 target gene that mediates proliferation of tAL1-expressing human T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med.* 2010;207:2141–2156.
52. Nagel S, Kaufmann M, Drexler HG, MacLeod RA. The cardiac homeobox gene NKX2-5 is deregulated by juxtaposition with BCL11B in pediatric T-ALL cell lines via a novel t(5;14)(q35.1;q32.2). *Cancer Res.* 2003;63:5329–5334.
53. Nagel S, Pommerenke C, Scherr M, et al. NKL homeobox gene activities in hematopoietic stem cells, T-cell development and T-cell leukemia. *PLoS ONE.* 2017;12:e0171164.
54. Homminga I, Pieters R, Meijerink JP. NKL homeobox genes in leukemia. *Leukemia.* 2012;26:572–581.
55. Patterson KD, Drysdale TA, Krieg PA. Embryonic origins of spleen asymmetry. *Development.* 2000;127:167–175.



Review

Innate lymphoid cells and their stromal microenvironments

Zoltán Kellermayer^{a,b}, Dóra Vojkovic^{a,b}, Péter Balogh^{a,b,*}^a Department of Immunology and Biotechnology, Szentágotthai Research Center, University of Pécs, Hungary^b Lymphoid Organogenesis Research Group, Szentágotthai Research Center, University of Pécs, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Innate lymphoid cells
Stroma
Development
Lymphoid tissue
Epithelium

ABSTRACT

In addition to the interaction between antigen presenting cells, T and B lymphocytes, recent studies have revealed important roles for a diverse set of auxiliary cells that profoundly influence the induction and regulation of immune responses against pathogens. Of these the stromal cells composed of various non-hematopoietic constituents are crucial for the creation and maintenance of specialized semi-static three-dimensional lymphoid tissue microenvironment, whereas the more recently described innate lymphoid cells are generated by the diversification of committed lymphoid precursor cells independently from clonally rearranged antigen receptor genes. Recent findings have revealed important contributions by innate lymphoid cells in inflammation and protection against pathogens in a tissue-specific manner. Importantly, lymphoid stromal cells also influence the onset of immune responses in tissue-specific fashion, raising the possibility of tissue-specific stromal – innate lymphoid cell collaboration. In this review we summarize the main features and interactions between these two cells types, with particular emphasis on ILC type 3 cells and their microenvironmental partners.

1. Introduction

The capacity to establish effective immune responses requires the presence of organized peripheral lymphoid organs. These sites are populated overwhelmingly with hematopoietic cells arranged into distinct anatomical territories following extravasation. The T and B cells together with various dendritic cells, macrophages and other myeloid cells are recruited to discrete territories created by sessile non-hematopoietic cells that form the three-dimensional tissue architecture as a stable physical platform, in addition to providing continuous instructions for the positioning, survival and expansion of hematopoietic cells [1]. Collectively these non-migratory constituents are referred to as stromal cells, and include several cell types with diverse developmental, structural and functional features that set them apart from the typically mobile hematopoietic cells. Compared to the hematopoietic cells, the precise analysis of these cells has been hampered by the lack of well-defined and specific markers, leading to cumbersome and difficult identification and isolation procedures. It is not surprising, therefore, that in a striking contrast with hematopoietic cells (that can be obtained from a variety of tissue sources in both rodents and humans with relative ease), the studies aimed at the stromal cells are lagging behind. Thus, despite their relatively early discovery, a clear discrepancy has remained between the available methodologies to study these cells and unraveling their apparent

functional importance.

One crucial role of the lymphoid stromal cells prevails during the embryonic formation of lymphoid organs, when the undifferentiated precursors of these cells at predetermined locations are organized into highly specialized tissues for the immunological protection of the individual after birth. Studying these events has led to a seminal discovery of one peculiar lymphoid cell type, termed lymphoid tissue inducer (LTi) cells, that has opened the way to identifying a previously unknown set of leukocytes [2,3]. These innate lymphoid cells (ILCs) form a diverse family of developmentally related hematopoietic cells, and are present at low abundance. However, they exert profound influences on the host organism's immunity [4,5]. In this review we briefly overview the main characteristics of these cells, and present a comprehensive summary of their relationship with their stromal microenvironment, thus connecting two minor cell subsets which, in turn, may influence a broad spectrum of mobile lymphocytes engaging in adaptive immune responses (Fig. 1).

2. Main features of ILCs with focus on ILC3s

Innate lymphoid cells are generated from common lymphoid progenitors under the influence of several transcription factors promoting the differentiation along non-T/B lineage. These include the transcriptional repressor inhibitor of DNA binding 2 (Id2) [6,7], GAT-

* Corresponding author at: Department of Immunology and Biotechnology, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary.
E-mail address: balogh.peter@pte.hu (P. Balogh).

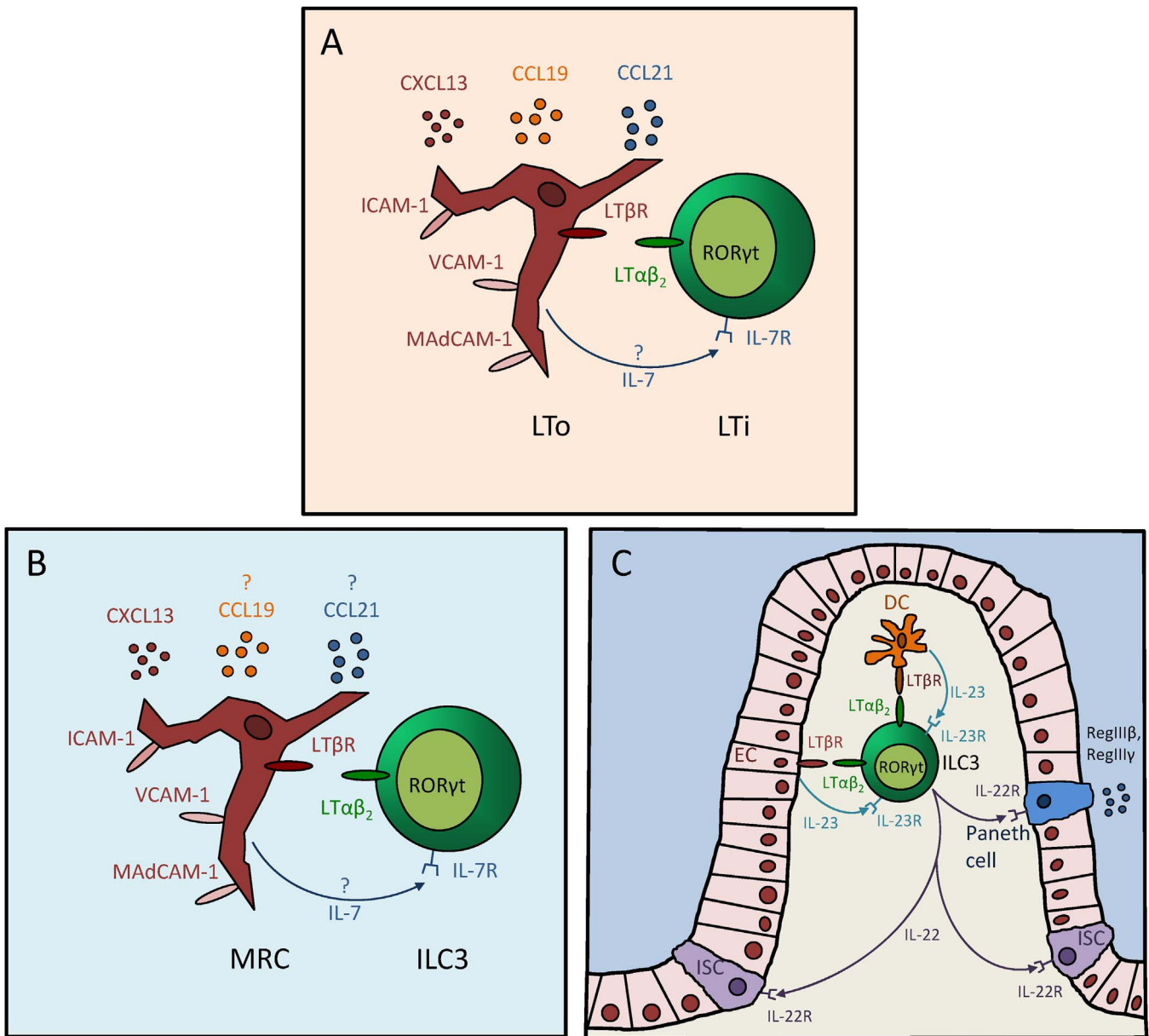


Fig. 1. ILC – stromal interactions. A, fetal lymph node anlagen; B, adult lymph node; C, adult lamina propria. Details are described in text. Abbreviations: LTo, lymphoid tissue organizer; LTi, lymphoid tissue inducer; MRC, marginal reticular cell; ILC3, innate lymphoid cell type 3; ISC, intestinal stem cell; EC, epithelial cell; DC, dendritic cell.

A-binding protein 3 (GATA3), promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF), nuclear factor interleukin-3 (Nfil3), T cell factor-1 (TCF1) and thymocyte selection associated high-mobility group box (TOX). Their intercellular communication requires the signaling through IL-7R γ chain and the binding of Flt3 ligand [8]. Although ILCs reside in lymphoid organs, they are most abundant at mucosal and barrier surfaces, where they form a complex defense system against extracellular bacteria, viruses and helminthes. Based primarily on their ability to produce Th1, Th2 and Th17/22 cell-associated cytokines respectively, ILCs can be divided into three groups—group 1 ILCs, group 2 ILCs and group 3 ILCs (ILC1-3) [9].

Discovered first, natural killer (NK) cells represent the prototypical cell of group 1 ILCs, which were reviewed in detail recently [10]. Briefly, type 1 ILCs in both humans and mice are a heterogeneous group of cells characterized by the expression of T-bet and the production of IFN γ . However, there exist subsets of ILC1 cells specific for various tissues, including the liver, intestine, thymus, and salivary glands [11]. NK cells were originally described to have important roles in the immune response against tumors, intracellular pathogens, and non-self

structures, acting mainly in a direct cytotoxic manner [12–14]. Due to the limited availability of specific markers for various ILC1 subsets, the exact function of these cells is hard to distinguish from that of the NK cells, although both cytotoxic and non-cytotoxic ILC1s have been described [15,16].

The second group of ILCs was first identified as Th2 cytokine-producing innate cells in mesenteric fat-associated lymphoid clusters and mucosa-containing tissues, including the gut and the airways. The development of these cells is regulated by a complex network of transcription factors such as GATA-3 and ROR α [6,17]. Upon stimulation by IL-25 and IL-33 ILC2s can induce allergy and asthma through the production of Th2 cytokines, and they also play an important role in intestinal parasitic worm clearance [18].

Group 3 ILCs comprise a phenotypically heterogeneous group of cells characterized by the expression of the ROR γ t transcription factor and the requirement of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) [19–22]. ILC3s are involved in developmental and regenerative processes during embryogenesis and also in postnatal life. These ROR γ t-dependent cells are most abundant in the intestinal lamina propria during inflammatory

processes, bacterial infections and lymphoid organogenesis. Based on the expression of chemokine receptor CCR6 and the natural cytotoxicity receptor (NCR) NKp46, ILC3s can be divided into 3 subtypes: the CCR6⁺ NKp46⁻ lymphoid tissue inducer (LTI) cells, CCR6⁻ NKp46⁺ ILC3s, and CCR6⁻ NKp46⁻ (double negative [DN]) ILC3s [23,24]. All three subgroups have been shown to be able to produce IL-17, IL-22, and IFN γ ; however, delicate differences can be observed in the function of these cells. LTIs are most important in the in utero (Peyer's patches and lymph nodes) and postnatal (isolated lymphoid follicles) organogenesis of lymphoid tissues by interacting with stromal lymphoid tissue organizer (LTo) cells [3,25,26]. CCR6⁻ NKp46⁺ ILC3s are most abundant in the small intestine and participate in the defense against infectious agents such as *Citrobacter rodentium* by secreting IL-22 [19]. CCR6⁻ NKp46⁻ DN ILC3s are particularly active in the inflamed colon of both humans and mice and produce mainly IFN γ and IL-17 [27]. IL-23R⁺ CCR6⁻ NKp46⁻ ILC3s were also shown to produce GM-CSF and mobilize from cryptopatches during the course of colitis [28].

Although the main fate-determining factors for various ILC subsets have been identified, their precise developmental programming is still not completely resolved, and may involve interlineage switches, as for example ROR γ t⁻ ILC1 (IFN γ -producing) subset can be generated from ILC3-primed progenitors expressing ROR γ t under the influence of IL-12 and IL-15 in murine colitis models or in human Crohn's disease [27,29,30]. Taken together, due to their variable occurrence during ontogeny (fetal or adult) and tissue accumulation preferences (peripheral lymphoid organs or intestinal or airway mucosa), various ILC subsets with distinct developmental and functional features are exposed to broadly divergent microenvironmental influences.

3. Stromal cells

Secondary lymphoid organs serve as meeting points for adaptive lymphocytes and their cognate antigens followed by activation, differentiation, and proliferation. The role of non-hematopoietic stromal cells in this process has been appreciated now for over two decades, and now these cells are recognized as active participants in the development and maintenance of structured lymphoid tissues, and also in mounting proper immune responses. Stromal cells are of mesenchymal origin and include follicular dendritic cells (FDC), fibroblastic reticular cells (FRC), marginal reticular cells (MRC), and blood- and lymphatic endothelial cells (BEC and LEC, respectively). Similarly to the lymphocytes, their tissue distribution is also characterized by compartmentalization and, consequently, preferential lymphocyte-stromal pairs, thus FDCs are mostly surrounded by B cells, whereas FRCs and endothelial cells (both BECs and LECs) are enriched in T-cell zones.

3.1. Fibroblastic reticular cells

FRCs are located in the T-cell rich interfollicular area in the lymph nodes and the T-cell rich periarteriolar lymphoid sheath (PALS) of the spleen [31,32]. These cells in mice express gp38/podoplanin and are ER-TR7⁺, and are believed to develop at secondary lymphoid organ anlagen from preadipocyte precursors which, upon signaling through LT β R, first differentiate into lymphoid tissue organizer cells (LTo) and then to myofibroblast precursors. Eventually these myofibroblasts then develop into FRCs in the postnatal lymph node [33,34]. FRCs have been shown to build a complex extracellular matrix network termed the conduit system. The conduit is a tubular system consisting mainly of type I and type III collagen fibers, surrounded by a basement membrane and then by FRCs themselves. This system is responsible for the transport of molecules with a weight below 70 kDa, including small soluble antigens [35,36]. Through the conduit the FRCs are connected with each other and also the high endothelial venules (HEVs) present in the paracortex of peripheral lymph nodes [37] and the marginal zone of the spleen [38]. Maintenance of HEVs is mediated by CLEC-2 signaling, the endogenous ligand for podoplanin. During inflammatory conditions

the podoplanin – CLEC-2 interaction influences the contractility of FRC-conduit system and thus controls the lymph node stromal microarchitecture [39].

In the lymph node T-cell zone, FRCs surround HEVs and play an important role in maintaining HEV integrity [37]. Following the extravasation of naïve T cells, FRCs provide IL-7 for their survival and homeostasis [40]. FRCs produce and secrete the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 (recognized by CCR7) and CXCL12 (recognized by CXCR4), creating a chemokine gradient via the conduit [41]. This gradient mediates the migration of not only T cells but also DCs during antigen presentation for T cells [42].

FRCs have also been found to play an important role in the activation and differentiation of T cells. Lee et al. demonstrated that FRCs participate in the development of CD8⁺ T cell tolerance against self-antigens [43]. FRCs were shown to acquire MHC class II from DCs in a contact-dependent manner, preventing the proliferation and survival of antigen-specific CD4⁺ T cells and tolerizing these cells [44]. Also, FRCs can limit the proliferation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, independently of antigen presentation [45]. A recent study performed by transplanting mesenteric lymph nodes into the popliteal fossa elegantly showed that FRCs (and/or other stromal cells) within mesenteric lymph nodes are, in cooperation with DCs, “imprinted” to induce the differentiation of regulatory T cells [46]. Intriguingly, FRCs also participate in the maintenance of follicular structure and B cell responses (via secretion of BAFF) as seen in mice where a targeted specific depletion of FRCs led to altered follicular microarchitecture and an impaired humoral response [47].

3.2. Follicular dendritic cells

Follicular dendritic cells (FDCs) are stromal cells located in the B-cell rich follicles of secondary lymphoid organs [48]. These cells originate from vascular mural cells and require LT and TNF for development but only LT for maintenance [49,50]. These signals are provided primarily by B cells, and as FDCs are responsible for the maintenance of the lymphoid follicle microarchitecture, it highlights the interdependence of the two cells on each other.

Signaling through the LT β R leads to the production of CXCL13, which increases B cell recruitment to the follicles and also induces LT production leading to a positive feedback loop [51]. Activation of the non-canonical NF κ B pathway during the germinal center response leads to the expression of ICAM-1, VCAM-1, and MADCAM-1 [52], which, in turn, modulates the interaction of FDCs with B cells. With the help of Fc receptors and complement receptors 1 and 2 FDCs are capable of binding and retaining antigens in the form of immunocomplexes over longer periods of time and present them to follicular B cells [53,54]. During this interaction, FDCs provide survival signals both for naïve and germinal center (GC) B cells, including BAFF and IL-6 [55].

3.3. Marginal reticular cells

Marginal reticular cells (MRCs) have been only recently described as a separate stromal cell entity when a CXCL13⁺/MADCAM-1⁺/RANKL⁺ but CCL21⁻ (indicative of FRCs) and CR1⁻ (present on FDCs) stromal population was discovered in the outer regions of the lymphoid tissues [31]. These cells are present in all secondary lymphoid organs and line the subcapsular sinus in lymph nodes, the marginal sinus of the spleen, and are located in the subepithelial dome of Peyer's patches [56,57]. The localization and the phenotype of adult MRCs strongly suggested that they are direct descendants of fetal LTo cells, and this was elegantly proven with lineage tracing IL-7⁺ stromal cells using an Il7-Cre⁺ Rosa26eYFP⁺ mouse strain [58]. A common feature of the localization of MRCs in the various lymphoid organs is the vicinity to the antigen entry routes, indicating a role in antigen sampling and transport and also lymphocyte entry [36,59,60].

The exact relationship between different stromal constituents is still

largely unknown in various lymphoid tissues. As the spleen as an organ seems to follow an LT_i-independent developmental programming, its stromal components may be patterned along a different pathway compared to that of lymph nodes and Peyer's patches. Furthermore, in addition to separate lineage specifications, the entire stromal architecture may be influenced in an organ-specific manner, thus the absence of Nkx2-3 homeodomain transcription factor causes a lymph node-like vascular patterning, lymphocyte composition and homing mechanism switch in spleen [61] without affecting the lymph node architecture. This organ-selective effect also points to the possibility of organ-specificity of lineage relatedness between various stromal subsets, as lineage-tracing experiments have shown that splenic FDCs, FRCs, and MRCs, but not endothelial cells, have a common Nkx2-5⁺ Islet1⁺ ancestor [62]; however, in lymph nodes a similar developmental derivation for stromal components has not been established yet. Importantly, in addition to different developmental pathways, organ-specific stromal cells may also crucially affect the lymphocyte homeostasis and tissue tropism, as mesenteric lymph node-derived stromal cells and spleen-derived dendritic cells could instruct T cells to gain in vivo gut tropism in a retinoic acid-dependent fashion, whereas peripheral lymph node stroma lacks such capacity [63].

In addition to the above well characterized stromal components present in various compartments of the resting lymphoid tissues, stimulation may lead to the appearance of (or transformation into) further stromal subsets, as recent studies have indicated. These include T-zone stromal cells that can be converted by centroblasts during GC reactions to produce large quantities of CXCL13, thus re-setting the T-B boundary (versatile stromal cells – VSCs; [64]) and within the dark zone, a special subset termed CXCL12-producing reticular cells (CRC) distinct from FDCs and FRCs [65], indicating that while spatially sessile, stromal cells can respond and adapt to their changing lymphocyte environment during immune responses.

3.4. Stromal cells of the intestine

The intestine harbors structured lymphoid tissues but also a massive population of lymphocytes with diffuse distribution. Peyer's patches of the small intestine and colonic patches in the colon develop in utero, and encompass a stromal network similar to that seen in lymph nodes with FDCs, FRCs, MRCs and MAdCAM-1⁺ HEVs. In contrast, solitary intestinal lymphoid tissues (SILT) are a group of inducible lymphoid tissues with cryptopatches (CP, containing mainly Lin⁻ cells) transforming into isolated lymphoid follicles (ILF, seeded with B cells and capable of mounting a GC response) upon various environmental triggers [21,66,67]. Within CPs and ILFs stromal cells expressing RANKL, FDC-M1, VCAM-1 and CD157 have been found that play an important role in the CP – ILF transition in a tissue-specific (small versus large intestine) manner [68,69].

Besides structured lymphoid tissues, the gut also contains several types of stromal cells within the intestinal wall. These include fibroblasts, myofibroblasts, pericytes, endothelial cells, smooth muscle cells and also blood endothelial and lymphatic endothelial cells [70,71]. Of these, the pericryptal myofibroblasts have been best characterized, and they are regarded as the most important stromal players in organizing the intestinal immune response. Recently, human intestinal myofibroblasts were shown to be VAP-1⁺ (vascular adhesion protein-1), while RNA for the Nkx2-3 transcription factor was specifically and significantly increased compared to activated skin fibroblast cell lines [72]. Importantly, Nkx2-3 in mice has also been demonstrated to be crucial for the endothelial specification of HEVs in Peyer's patches, as its lack induced the replacement of MAdCAM-1 with PNAd and caused L-selectin dependent homing of lymphocytes [73].

In general, stromal cells of the intestine engage in a bidirectional communication with the overlying epithelial cells. Stromal cells support the maintenance of epithelial cells [74], while factors produced by the epithelium are important for the differentiation and proliferation of

stromal cells [75]. Stromal cells can be activated by TNF α and induce intestinal inflammation in mice [76,77]. Several results suggest that stromal cells can acquire an inflammatory phenotype and influence the intestinal pathology in humans [71]. Furthermore, increased production of TNF α by myeloid cells can be sufficient to launch a non-LT_i-driven formation of secondary lymphoid tissues, which may be similar to the inflammation-driven development of intestinal tertiary lymphoid tissues, with preserved dependence for LT β R engagement and maturation of stromal elements co-expressing ICAM-1 and VCAM-1 [78].

4. Stromal cell—ILC interactions

The dynamic crosstalk of FRCs with T cells and FDCs with B cells, respectively, has been extensively studied and characterized. In contrast, relatively little is known about the interactions of the various stromal constituents with ILC subgroups.

The most studied and best-known communication between ILCs and their stromal microenvironment is the LT_i (ILC3) – LTo interaction taking place at anlagen of secondary lymphoid organs in utero, which is crucial for lymphoid organogenesis [reviewed in 26]. LTo cells produce IL-7, which binds to IL-7R on LT_i cells and enhances the expression of LT α β ₂ on these cells [79]. This, in turn, binds to LT β R on LTo cells and activates the non-canonical NF κ B pathway, leading to the upregulated expression of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, MAdCAM-1) and homeostatic chemokines (CCL19, CCL21, CXCL13) needed for the recruitment of further LT_i cells and, later, mature T and B lymphocytes [80–82]. In general, these interactions are required for the formation of peripheral and mesenteric lymph nodes, Peyer's patches and the solitary intestinal lymphoid tissues (SILT, encompassing cryptopatches and isolated lymphoid follicles) with organ-specific features [83].

The morphogenic function of LT β R and its ligand binding manifests in both the context of the activity of other members of the TNF superfamily and tissue-specific fashion, as for lymph node development RANK-TRANCE binding is necessary, whereas Peyer's patches and spleen form independently of this latter interaction. Furthermore, while the spleen as a solid organ is formed in the absence of LT β R activity, Peyer's patches are absent [84–86]. Moreover, once the LT α β ₂-elicited signaling by LT_i cells has launched the lymphoid organ formation at predestined anatomical sites, further members of TNF/LT family (such as TNF or CD30) involving mature T and B cells probably fine-tune the lymphoid compartments to gain functional competence [87,88].

Recently, LTo cells were identified in human fetal lymph node anlagen with a phenotype and chemokine production similar to that observed in mice [58]. MRCs of adult lymph nodes developed from a subset of these putative LTo cells in both humans and mice. Fetal and also adult ROR γ ⁺ CD3⁻ ILC3 cells were shown to colocalize with these cells in humans and mice, indicating that the LTo – MRC lineage provides a lifelong niche for these cells. The exact role of ILC3 cells in adult lymph nodes and the significance of the MRC – ILC3 interaction, however, are still unknown.

A similar niche was described for NK1.1⁺ NKp46⁺ group 1 ILCs and/or NK cells with FRCs as the stromal partner [89]. In a mouse model with an FRC-restricted deletion of MyD88, infection with the mouse hepatitis virus (MHV) led to significantly higher number of NK1.1⁺ NKp46⁺ cells, which colocalized with CCL19⁺ FRCs in PPs and mLNs. FRCs were shown to maintain group 1 ILC homeostasis via IL-15 production as FRC-specific ablation of IL-15 led to an almost complete absence of group 1 ILCs.

As intestinal ILCs in adult localize mainly not in structured lymphoid tissues but are rather dispersed throughout the subepithelial tissues and the lamina propria, they are most probably influenced by intestinal stromal cells. However, limited research data can be found on interactions between intraepithelial and lamina propria ILCs and “conventional” stromal cells of mesenchymal origin. On the other hand, the bidirectional communication of ILCs with epithelial cells significantly contributes to the maintenance of mucosal integrity and is

better characterized. Besides IL-23, ILC3 activation and maintenance is regulated by IL-7 and TSLP and these cytokines are most probably provided to group 3 innate lymphoid cells by stromal cells such as fibroblasts and epithelial cells [90]. Since it has been shown that IL-7 production by epithelial cells can be regulated by intestinal bacteria [27,91], this indicates that the microbiota influences ILC3 functionality [19].

During DSS-induced epithelial injury epithelial cells were shown to secrete IL-23 in an LT β R-dependent manner [92]. IL-23 activates IL-23R⁺ ILC3 cells, which, in turn, produce large quantities of IL-22. IL-22 then activates Paneth cells to secrete various anti-microbial peptides (RegIII β , RegIII γ , and other mucins) leading to mucosal healing and epithelial cell regeneration [93,94]. Engagement of LT β R on intestinal epithelial cells (IEC) leads to IL-23 production via the IKK α -mediated non-canonical NF κ B pathway, revealed by IEC-specific deletions of IKK α (IKK α^{Δ IEC mice) or IKK β (IKK β^{Δ IEC mice) [95]. IKK α^{Δ IEC mice infected with the attaching-effacing pathogen *Citrobacter rodentium* showed greater weight loss and an impaired IL-22 response by ILC3s compared to wild type littermates. Interestingly, mRNA for *Il-23a* was not decreased in IKK α^{Δ IEC mice; however, *Tslp* mRNA and TSLP protein were significantly increased. Administration of TSLP to C57BL/6 mice led to a reduced IL-22 production by ILCs while treating IKK α^{Δ IEC mice with a neutralizing anti-TSLP antibody partially protected mice from symptoms of *C. rodentium* infection and restored IL-22 production.

In another mouse model where administration of methotrexate (MTX) causes small intestinal damage, ILC3s were shown to influence epithelial regeneration by directly interacting with intestinal stem cells (ISCs) [96]. ILC3s were activated in response to epithelial damage, while ROR γ t^{-/-} mice lacking ILC3s presented with a more severe small intestinal injury and a higher rate of Lgr5⁺ crypt ISC loss upon MTX treatment. Adding a neutralizing antibody against IL-22 during MTX treatment of wild-type mice impaired recovery, indicating that ILC3s have role in ISC maintenance via IL-22 secretion.

Another source for the IL-23 needed to activate ILC3s are CD11c⁺ dendritic cells [97]. During infection with *C. rodentium* LT β R⁺ dendritic cells and LT α β 2⁺ ROR γ t⁺ IL-22-producing ILC3 cells colocalized in isolated lymphoid follicles. Dendritic cell-specific lack of LT β R led to decreased *Il-23* mRNA, while in the absence of either LT α β 2 from ILC3 cells or LT β R from dendritic cells, respectively, IL-22 production by ILC3 cells was diminished.

Interestingly, several data have emerged recently on ILC – stromal interactions in the decidua [98]. The decidua creates a tolerogenic environment towards fetal antigens. During this process decidual stromal cells (DSC) recruit NK cells [99] to the decidua and induce them to gain a “decidual NK” (dNK) phenotype by modifying the expression of activating and inhibitory receptors on NK surface [100]. ILC3s have also been shown to be present in the decidua and they are capable of upregulating ICAM-1 and VCAM-1 on DSC [101]. It is hypothesized that this interaction might be important in the placentation process.

Further to immune responses against infectious agents, defense against tumors also represent an important area for research on ILC – stroma interactions, beyond the involvement of ILC-mediated effects on adaptive effector lymphocytes or NK cells. Several findings already have reported the importance on the inflammatory or suppressive microenvironment and its relationship with various ILC subsets in the promotion or eradication of solid tissue tumors [102,103], but clearly, further studies are needed.

5. Conclusions

The important roles stromal cells play in regulating the immune response have been recognized for over a decade now. Meanwhile, innate lymphoid cells are now one of the most extensively studied cell type. However, interactions between stromal cells and ILCs, either within structured lymphoid tissues or dispersed throughout the gut

lamina propria, have been so far poorly characterized. As stromal cells influence the activation, differentiation and regulation of adaptive T and B cells, one can hypothesize the same scenario regarding innate lymphoid cells, both under physiological immune responses against external pathogens and in anti-tumor defense, as well as chronic inflammatory or autoimmune conditions, as reviewed recently [104]. The significance of understanding the molecular communications taking place in both directions can not be overestimated. Proper knowledge from in vivo studies or in vitro bioengineered 3D lymphoid organoid models [105] will lead to therapeutic consequences in a variety of inflammatory conditions where ILCs are important players.

Acknowledgements

This work was supported by GINOP2.3.2-15-2016-00022 grant at the University of Pécs. ZK is supported by the Apáczai Csere János Fellowship in the framework of SROP 4.2.4. A/1-11-1-2012-0001 ‘National Excellence Program’ and the postdoctoral research grant of the Faculty of Medicine, University of Pécs. PB is supported by the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K108429). The project has been supported by the European Union, co-financed by the European Social Fund.

References

- [1] T.D. Randall, D.M. Carragher, J. Rangel-Moreno, Development of secondary lymphoid organs, *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008) 627–650.
- [2] R.E. Mebius, P.R. Streeter, S. Michie, E.C. Butcher, I.L. Weissman, A developmental switch in lymphocyte homing receptor and endothelial vascular addressin expression regulates lymphocyte homing and permits CD4 + CD3- cells to colonize lymph nodes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (20) (1996) 11019–11024.
- [3] R.E. Mebius, P. Rennert, I.L. Weissman, Developing lymph nodes collect CD4 + CD3- LTbeta + cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not to T or B cells, *Immunity* 7 (4) (1997) 493–504.
- [4] D. Artis, H. Spits, The biology of innate lymphoid cells, *Nature* 517 (7534) (2015) 293–301.
- [5] C.S. Klose, D. Artis, Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis, *Nat. Immunol.* 17 (7) (2016) 765–774.
- [6] K. Moro, T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii, S. Koyasu, Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells, *Nature* 463 (7280) (2010) 540–544.
- [7] M. Cherrier, S. Sawa, G. Eberl, Notch, Id2, and ROR(t sequentially orchestrate the fetal development of lymphoid tissue inducer cells, *J. Exp. Med.* 209 (4) (2012) 729–740.
- [8] H. Spits, T. Cupedo, Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function, *Annu. Rev. Immunol.* 30 (2012) 647–675.
- [9] H. Spits, D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, J.P. Di Santo, G. Eberl, S. Koyasu, R.M. Locksley, A.N. McKenzie, R.E. Mebius, F. Powrie, E. Vivier, Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2) (2013) 145–149.
- [10] H. Spits, J.H. Bernink, L. Lanier, NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense, *Nat. Immunol.* 17 (7) (2016) 758–764.
- [11] D.K. Sojka, B. Plougastel-Douglas, L. Yang, M.A. Pak-Wittel, M.N. Artyomov, Y. Ivanova, C. Zhong, J.M. Chase, P.B. Rothman, J. Yu, J.K. Riley, J. Zhu, Z. Tian, W.M. Yokoyama, Tissue-resident natural killer (NK) cells are cell lineages distinct from thymic and conventional splenic NK cells, *Elife* 3 (2014) e01659.
- [12] K. Kärre, H.G. Ljunggren, G. Piontek, R. Kiessling, Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy, *Nature* 319 (6055) (1986) 675–678.
- [13] R.E. Berg, E. Crossley, S. Murray, J. Forman, Relative contributions of NK and CD8T cells to IFN-gamma mediated innate immune protection against *Listeria monocytogenes*, *J. Immunol.* 175 (3) (2005) 1751–1757.
- [14] H.G. Ljunggren, K. Kärre, In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition, *Immunol. Today* 11 (7) (1990) 237–244.
- [15] C.S. Klose, M. Flach, L. Möhle, L. Rogell, T. Hoyler, K. Ebert, C. Fabiunke, D. Pfeifer, V. Sexl, D. Fonseca-Pereira, R.G. Domingues, H. Veiga-Fernandes, S.J. Arnold, M. Busslinger, I.R. Dunay, Y. Tanriver, A. Diefenbach, Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages, *Cell* 157 (2) (2014) 340–356.
- [16] M. Ochi, H. Ohdan, H. Mitsuta, T. Onoe, D. Tokita, H. Hara, K. Ishiyama, W. Zhou, Y. Tanaka, T. Asahara, Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice, *Hepatology* 39 (5) (2004) 1321–1331.
- [17] L.A. Monticelli, G.F. Sonnenberg, M.C. Abt, T. Alenghat, C.G. Ziegler, T.A. Doering, J.M. Angelosanto, B.J. Laidlaw, C.Y. Yang, T. Sathiyawala, M. Kubota, D. Turner, J.M. Diamond, A.W. Goldrath, D.L. Farber, R.G. Collman, E.J. Wherry, D. Artis, Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus, *Nat. Immunol.* 12 (11) (2011) 1045–1054.

- [18] J.A. Walker, A.N. McKenzie, Development and function of group 2 innate lymphoid cells, *Curr. Opin. Immunol.* 25 (2) (2013) 148–155.
- [19] N. Satoh-Takayama, C.A. Voshenrich, S. Lesjean-Pottier, S. Sawa, M. Lochner, F. Rattis, J.J. Mention, K.T. Hiam, N. Cerf-Bensussan, O. Mandelblom, G. Eberl, J.P. Di Santo, Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKP46+ cells that provide innate mucosal immune defense, *Immunity* 29 (6) (2008) 958–970.
- [20] C. Luci, A. Reyniers, I.I. Ivanov, C. Cognet, L. Chiche, L. Chasson, J. Hardwigen, E. Anguiano, J. Banchereau, D. Chaussabel, M. Dalod, D.R. Littman, E. Vivier, E. Tomasello, Influence of the transcription factor RORgammat on the development of NKP46+ cell populations in gut and skin, *Nat. Immunol.* 10 (1) (2009) 75–82.
- [21] E.A. Kiss, C. Vonarbourg, S. Kopfmann, E. Hobeika, D. Finke, C. Esser, A. Diefenbach, Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles, *Science* 334 (6062) (2011) 1561–1565.
- [22] J. Qiu, J.J. Heller, X. Guo, Z.M. Chen, K. Fish, Y.X. Fu, L. Zhou, The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through the modulation of innate lymphoid cells, *Immunity* 36 (1) (2012) 92–104.
- [23] C.S. Klose, E.A. Kiss, V. Schwierzeck, K. Ebert, T. Hoyler, Y. d'Hargues, N. Göppert, A.L. Croxford, A. Waisman, Y. Tanriver, A. Diefenbach, A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-RORγt+ innate lymphoid cells, *Nature* 494 (7436) (2013) 261–265.
- [24] M.L. Robinette, A. Fuchs, V.S. Cortez, J.S. Lee, Y. Wang, S.K. Durum, S. Gilfillan, M. Colonna, Immunological Genome Consortium, Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets, *Nat. Immunol.* 16 (13) (2015) 306–317.
- [25] M. Tsuji, K. Suzuki, H. Kitamura, M. Maruya, K. Kinoshita, I.I. Ivanov, K. Itoh, D.R. Littman, S. Fagarasan, Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut, *Immunity* 29 (2) (2008) 261–271.
- [26] R.E. Mebius, Organogenesis of lymphoid tissues, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (4) (2003) 292–303.
- [27] C. Vonarbourg, A. Mortha, V.L. Bui, P.P. Hernandez, E.A. Kiss, T. Hoyler, M. Flach, B. Bengsch, R. Thimme, C. Hölscher, M. Höning, U. Pannicke, K. Schwarz, C.F. Ware, D. Finke, A. Diefenbach, Regulated expression of nuclear receptor RORγt confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing RORγt(+) innate lymphocytes, *Immunity* 33 (5) (2010) 736–751.
- [28] C. Pearson, E.E. Thornton, B. McKenzie, A.L. Schaupp, N. Huskens, T. Griseri, N. West, S. Tung, B.P. Seddon, H.H. Uhlig, F. Powrie, ILC3 GM-CSF production and mobilisation orchestrate acute intestinal inflammation, *Elife* 5 (2016) e10066.
- [29] M. Cella, K. Otero, M. Colonna, Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1β reveals intrinsic functional plasticity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (24) (2010) 10961–10966.
- [30] J.H. Bernink, C.P. Peters, M. Munneke, A.A. te Velde, S.L. Meijer, K. Weijer, H.S. Hreggvidsdottir, S.E. Heinsbroek, N. Legrand, C.J. Buskens, W.A. Bemelmans, J.M. Mjösberg, H. Spits, Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues, *Nat. Immunol.* 14 (3) (2013) 221–229.
- [31] T. Kataikai, T. Hara, M. Sugai, H. Gonda, A. Shimizu, Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes, *J. Exp. Med.* 200 (6) (2004) 783–795.
- [32] J.M. den Haan, R.E. Mebius, G. Kraal, Stromal cells of the mouse spleen, *Front. Immunol.* 3 (2012) 201.
- [33] C. Bénézech, E. Mader, G. Desanti, M. Khan, K. Nakamura, A. White, C.F. Ware, G. Anderson, J.H. Caamaño, Lymphotoxin-β receptor signaling through NF-κB2-RelB pathway reprograms adipocyte precursors as lymph node stromal cells, *Immunity* 37 (4) (2012) 721–734.
- [34] Q. Chai, L. Onder, E. Scandella, C. Gil-Cruz, C. Perez-Shibayama, J. Cupovic, R. Danuser, T. Sparwasser, S.A. Luther, V. Thiel, T. Rüllicke, J.V. Stein, T. Hehlhans, B. Ludewig, Maturation of lymph node fibroblastic reticular cells from myofibroblastic precursors is critical for anti-viral immunity, *Immunity* 38 (5) (2013) 1013–1024.
- [35] M.A. Nolte, J.A. Belien, I. Schadee-Eestermans, W. Jansen, W.W. Unger, N. van Rooijen, G. Kraal, R.E. Mebius, A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp, *J. Exp. Med.* 198 (3) (2003) 505–512.
- [36] R. Roozendaal, T.R. Mempel, L.A. Pitcher, S.F. Gonzales, A. Verschoor, R.E. Mebius, U.H. von Andrian, M.C. Carroll, Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles, *Immunity* 30 (2) (2009) 264–276.
- [37] B.H. Herzog, J. Fu, S.J. Wilson, P.R. Hess, A. Sen, J.M. McDaniel, Y. Pan, M. Sheng, T. Yago, R. Silasi-Mansat, S. McGee, F. May, B. Nieswandt, A.J. Morris, F. Lupu, S.R. Coughlin, R.P. McEver, H. Chen, M.L. Kahn, L. Xia, Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2, *Nature* 502 (7469) (2013) 105–109.
- [38] S.N. Mueller, R. Ahmed, Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses, *Immunol. Rev.* 224 (2008) 284–294.
- [39] J.L. Astarita, V. Cremasco, J. Fu, M.C. Darnell, J.R. Peck, J.M. Nieves-Bonilla, K. Song, Y. Kondo, M.C. Woodruff, A. Goginini, L. Onder, B. Ludewig, R.M. Weimer, M.C. Carroll, D.J. Mooney, L. Xia, S.J. Turley, The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture, *Nat. Immunol.* 16 (1) (2015) 75–84.
- [40] A. Link, T.K. Vogt, S. Favre, M.R. Britschgi, H. Acha-Orbea, B. Hinz, J.G. Cyster, S.A. Luther, Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naïve T cells, *Nat. Immunol.* 8 (11) (2007) 1255–1265.
- [41] S.A. Luther, H.L. Tang, P.L. Hyman, A.G. Farr, J.G. Cyster, Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (23) (2000) 12694–12699.
- [42] M. Bajenoff, J.G. Egen, L.Y. Koo, J.P. Laugier, F. Brau, N. Glaichenhaus, R.N. Germain, Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes, *Immunity* 25 (6) (2006) 989–1001.
- [43] J.W. Lee, M. Eparaud, J. Sun, J.E. Becker, A.C. Cheng, A.R. Yonekura, J.K. Heath, S.J. Turley, Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self, *Nat. Immunol.* 8 (2) (2007) 181–190.
- [44] J. Dubrot, F.V. Duraes, L. Potin, F. Capotosti, D. Brighouse, T. Suter, S. Leibundgut-Landmann, N. Garbi, W. Reith, M.A. Swartz, S. Hugues, Lymph node stromal cells acquire peptide-MHCII complexes from dendritic cells and induce antigen-specific CD4+ T cell tolerance, *J. Exp. Med.* 211 (6) (2014) 1153–1166.
- [45] V. Lukacs-Kornek, D. Malhotra, A.L. Fletcher, S.E. Acton, K.G. Elpek, P. Tayalia, A.R. Collier, S.J. Turley, Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes, *Nat. Immunol.* 12 (11) (2011) 1096–1104.
- [46] S. Cording, B. Wahl, D. Kulkarni, H. Chopra, J. Pezoldt, M. Buettner, A. Dummer, U. Hadis, M. Heimesaat, S. Bereswill, C. Falk, U. Bode, A. Hamann, D. Fleissner, J. Huehn, O. Pabst, The intestinal micro-environment imprints stromal cells to promote efficient Treg induction in gut-draining lymph nodes, *Mucosal Immunol.* 7 (2) (2014) 359–368.
- [47] V. Cremasco, M.C. Woodruff, L. Onder, J. Cupovic, J.M. Nieves-Bonilla, F.A. Schildberg, J. Chang, F. Cremasco, C.J. Harvey, K. Wucherpfennig, B. Ludewig, M.C. Carroll, S.J. Turley, B cell homeostasis and follicle confines are governed by fibroblastic reticular cells, *Nat. Immunol.* 15 (10) (2014) 973–981.
- [48] A. Aguzzi, N.J. Krautler, Characterizing follicular dendritic cells: a progress report, *Eur. J. Immunol.* 40 (8) (2010) 2134–2138.
- [49] N.J. Krautler, V. Kana, J. Kranich, Y. Tian, D. Perera, D. Lemm, P. Schwarz, A. Armulik, J.L. Browning, M. Tallquist, T. Buch, J.B. Oliveira-Martins, C. Zhu, M. Hermann, U. Wagner, R. Brink, M. Heikenwalder, A. Aguzzi, Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors, *Cell* 150 (1) (2012) 194–206.
- [50] F. Mackay, G.R. Majeau, P. Lawton, P.S. Hochman, J.L. Browning, Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice, *Eur. J. Immunol.* 27 (8) (1997) 2033–2042.
- [51] A. Aguzzi, J. Kranich, N.J. Krautler, Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease, *Trends Immunol.* 35 (3) (2016) 105–113.
- [52] R.C. Myers, R.G. King, R.H. Carter, L.B. Justement, Lymphotoxin α1β2 expression on B cells is required for follicular dendritic cell activation during the germinal center response, *Eur. J. Immunol.* 43 (2) (2013) 348–359.
- [53] C.D. Allen, J.G. Cyster, Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function, *Semin. Immunol.* 20 (1) (2008) 14–25.
- [54] M.E. El Shikh, R.M. El Sayed, S. Sukumar, A.K. Szakal, J.G. Tew, Activation of B cells by antigens on follicular dendritic cells, *Trends Immunol.* 31 (6) (2010) 205–211.
- [55] X. Wang, B. Cho, K. Suzuki, Y. Xu, J.A. Green, J. An, J.G. Cyster, Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers, *J. Exp. Med.* 208 (12) (2011) 2497–2510.
- [56] T. Kataikai, H. Suto, M. Sugai, H. Gonda, A. Togawa, S. Suematsu, Y. Ebisuno, K. Katagiri, T. Kinashi, A. Shimizu, Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult lymphoid organs, *J. Immunol.* 181 (9) (2008) 6189–6200.
- [57] K.A. Knoop, N. Kumar, B.R. Butler, S.K. Sakthivel, R.T. Taylor, T. Nochi, H. Akiba, H. Yagita, H. Kiyono, I.R. Williams, RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium, *J. Immunol.* 183 (9) (2009) 5738–5747.
- [58] K. Hoorweg, P. Narang, Z. Li, A. Thuery, N. Papazian, D.R. Withers, M.C. Coles, T. Cupedo, A stromal cell niche for human and mouse type 3 innate lymphoid cells, *J. Immunol.* 195 (9) (2015) 4257–4263.
- [59] M. Bajenoff, R.N. Germain, B-cell follicle development remodels the conduit system and allows soluble antigen delivery to follicular dendritic cells, *Blood* 114 (24) (2009) 4989–4997.
- [60] J.J. Koning, R.E. Mebius, Interdependence of stromal and immune cells for lymph node function, *Trends Immunol.* 33 (6) (2012) 264–270.
- [61] T. Czömpöly, A. Lábadi, Z. Kellermayer, K. Olasz, H.H. Arnold, P. Balogh, Transcription factor Nkx2-3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen, *J. Immunol.* 186 (12) (2011) 6981–6989.
- [62] L. Castagnaro, E. Lentí, S. Maruzzelli, L. Spinardi, E. Migliori, D. Farinello, G. Sitia, Z. Harrelson, S.M. Evans, L.G. Guidotti, R.P. Harvey, A. Brendolan, Nkx2-5(+) islet1(+) mesenchymal precursors generate distinct spleen stromal cell subsets and participate in restoring stromal network integrity, *Immunity* 38 (4) (2013) 782–791.
- [63] S.I. Hammerschmidt, M. Ahrendt, U. Bode, B. Wahl, E. Kremmer, R. Förster, O. Pabst, Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo, *J. Exp. Med.* 205 (11) (2008) 2483–2490.
- [64] C. Mionnet, I. Mondor, A. Jorquera, M. Loosveld, J. Maurizio, M.L. Arcangeli, N.H. Ruddle, J. Nowak, M. Aurrand-Lions, H. Luche, M. Bajenoff, Identification of a new stromal cell type involved in the regulation of inflamed B cell follicles, *PLoS Biol.* 11 (10) (2013) e1001672.
- [65] L.B. Rodda, O. Bannard, B. Ludewig, T. Nagasawa, J.G. Cyster, Phenotypic and morphological properties of Germinal Center DarkZone Cxcl12-expressing reticular cells, *J. Immunol.* 195 (10) (2015) 4781–4791.
- [66] D. Bouskra, C. Brézillon, M. Bérand, C. Werts, R. Varona, I.G. Boneca, G. Eberl, Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis, *Nature* 456 (7221) (2008) 507–510.
- [67] A.P. Baptista, B.J. Olivier, G. Goverse, M. Greuter, M. Knippenberg, K. Kusser, R.G. Domingues, H. Veiga-Fernandes, A.D. Luster, A. Lugering, T.D. Randall,

- T. Cupedo, R.E. Mebius, Colonic patch and colonic SILT development are independent and differentially regulated events, *Mucosal Immunol.* 6 (3) (2013) 511–521.
- [68] R.T. Taylor, S.R. Patel, E. Lin, B.R. Butler, J.G. Lake, R.D. Newberry, I.R. Williams, Lymphotoxin-independent expression of TNF-related activation-induced cytokine by stromal cells in cryptopatches, isolated lymphoid follicles, and Peyer's patches, *J. Immunol.* 178 (9) (2007) 5659–5667.
- [69] A.K. Knoop, B.R. Butler, N. Kumar, R.D. Newberry, I.R. Williams, Distinct developmental requirements for isolated lymphoid follicle formation in the small and large intestine, *Am. J. Pathol.* 179 (4) (2011) 1861–1871.
- [70] D.W. Powell, I.V. Pinchuk, J.I. Saada, X. Chen, R.C. Mifflin, Mesenchymal cells of the lamina propria, *Annu. Rev. Physiol.* 73 (2011) 213–237.
- [71] B.M. Owens, A. Simmons, Intestinal stromal cells in mucosal immunity and homeostasis, *Mucosal Immunol.* 6 (2) (2013) 224–234.
- [72] L.T. Hsia, N. Ashley, D. Ouaret, L.M. Wang, J. Wilding, W.F. Bodmer, Myofibroblasts are distinguished from activated skin fibroblasts by the expression of AOC3 and other associated markers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (15) (2016) E2161–E2171.
- [73] Z. Kellermayer, M. Mihajl, Á. Lábadi, T. Czömpöly, M. Lee, E. O'Hara, E.C. Berta, G. Berta, A. Balogh, H.H. Arnold, P. Balogh, Absence of Nkx2-3 homeodomain transcription factor reprograms the endothelial addressin preference for lymphocyte homing in Peyer's patches, *J. Immunol.* 193 (10) (2014) 5284–9523.
- [74] N. Lahar, N.Y. Lei, J. Wang, Z. Jabaji, S.C. Tung, V. Joshi, M. Lewis, M. Stelzner, M.G. Martyn, J.C. Dunn, Intestinal subepithelial myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium, *PLoS One* 6 (11) (2011) e26898.
- [75] C. Kosinski, D.E. Stange, C. Xu, A.S. Chan, C. Ho, S.T. Yuen, R.C. Mifflin, D.W. Powell, H. Clevers, S.Y. Leung, X. Chen, Indian hedgehog regulates intestinal stem cell fate through epithelial-mesenchymal interactions during development, *Gastroenterology* 139 (3) (2010) 893–903.
- [76] M. Armaka, M. Apostolaki, P. Jacques, D.L. Kontoyiannis, D. Elewaut, G. Kollias, Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal disease, *J. Exp. Med.* 205 (2) (2008) 331–337.
- [77] M. Roulis, M. Armaka, M. Manoloukos, M. Apostolaki, G. Kollias, Intestinal epithelial cells as producers but not targets of chronic TNF suffice to cause murine Crohn-like pathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (13) (2011) 5396–5401.
- [78] G.C. Furtado, M.E. Pacer, G. Bongers, C. Bénézéch, Z. He, L. Chen, M.C. Berin, G. Kollias, J.H. Caamaño, S.A. Lira, TNF α -dependent development of lymphoid tissue in the absence of ROR γ t lymphoid tissue inducer cells, *Mucosal Immunol.* 7 (3) (2014) 602–614.
- [79] H. Yoshida, A. Naito, J. Inoue, M. Satoh, S.M. Santee-Cooper, C.F. Ware, A. Togawa, S. Nishikawa, S. Nishikawa, Different cytokines induce surface lymphotoxin-alpha on IL-7 receptor-alpha cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches, *Immunity* 17 (6) (2002) 823–833.
- [80] E. DeJardin, N.M. Droin, M. Delhase, E. Haas, Y. Cao, C. Makris, Z.W. Li, M. Karin, C.F. Ware, D.R. Green, The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways, *Immunity* 17 (4) (2002) 525–535.
- [81] V.N. Ngo, H. Korner, M.D. Gunn, K.N. Schmidt, D.S. Riminton, M.D. Cooper, J.L. Browning, J.D. Sedgwick, J.G. Cyster, Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen, *J. Exp. Med.* 189 (2) (1999) 403–412.
- [82] C.A. Cuff, R. Sacca, N.H. Ruddie, Differential induction of adhesion molecule and chemokine expression by LTalpha3 and LTalpha4 in inflammation elucidates potential mechanisms of mesenteric and peripheral lymph node development, *J. Immunol.* 162 (10) (1999) 5965–5972.
- [83] S.A. van de Pavert, R.E. Mebius, New insights into the development of lymphoid tissues, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (9) (2010) 664–674.
- [84] A. Naito, S. Azuma, S. Tanaka, T. Miyazaki, S. Takaki, K. Takatsu, K. Nakao, K. Nakamura, M. Katsuki, T. Yamamoto, J. Inoue, Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice, *Genes Cells* 4 (6) (1999) 353–362.
- [85] Y.Y. Kong, H. Yoshida, I. Sarosi, H.L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A.J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C.R. Dunstan, D.L. Lacey, T.W. Mak, W.J. Boyle, J.M. Penninger, OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis, *Nature* 397 (6717) (1999) 315–323.
- [86] D. Kim, R.E. Mebius, J.D. MacMicking, S. Jung, T. Cupedo, Y. Castellanos, J. Rho, B.R. Wong, R. Josien, N. Kim, P.D. Rennett, Y. Choi, Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE, *J. Exp. Med.* 192 (10) (2000) 1467–1478.
- [87] M. Pasparakis, L. Alexopoulou, V. Episkopou, G. Kollias, Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response, *J. Exp. Med.* 184 (4) (1996) 1397–1411.
- [88] V. Bekiaris, F. Gaspal, M.Y. Kim, D.R. Withers, F.M. McConnell, G. Anderson, P.J. Lane, CD30 is required for CCL21 expression and CD4T cell recruitment in the absence of lymphotoxin signals, *J. Immunol.* 182 (8) (2009) 4771–4775.
- [89] C. Gil-Cruz, C. Perez-Shibayama, L. Onder, Q. Chai, J. Cupovic, H.W. Cheng, M. Novkovic, P.A. Lang, M.B. Geuking, K.D. McCoy, S. Abe, G. Cui, K. Ikuta, E. Scandella, B. Ludewig, Fibroblastic reticular cells regulate intestinal inflammation via IL-15-mediated control of group 1 ILCs, *Nat. Immunol.* 17 (12) (2016) 1388–1396.
- [90] C. Vonarbourg, A. Diefenbach, Multifaceted roles of interleukin-7 signaling for the development and function of innate lymphoid cells, *Semin. Immunol.* 24 (3) (2012) 165–174.
- [91] S. Shalpour, K. Geiser, O. Sercan, J. Tuckermann, K. Minnick, G. Willmsky, T. Blankenstein, G.J. Hämmerling, B. Arnold, T. Schüler, Commensal microflora and interferon-gamma promote steady-state interleukin-7 production in vivo, *Eur. J. Immunol.* 40 (9) (2010) 2391–2400.
- [92] E. Macho-Fernandez, E.P. Koroleva, C.M. Spencer, M. Tighe, E. Torrado, A.M. Cooper, Y.X. Fu, A.V. Tumanov, Lymphotoxin beta receptor signaling limits mucosal damage through driving IL-23 production by epithelial cells, *Mucosal Immunol.* 8 (2) (2015) 403–413.
- [93] K. Sugimoto, A. Ogawa, E. Mizoguchi, Y. Shimomura, A. Andoh, A.K. Bhan, R.S. Blumberg, R.J. Xavier, A. Mizoguchi, IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis, *J. Clin. Invest.* 118 (2) (2008) 534–544.
- [94] L.A. Zenciewicz, G.D. Yancopoulos, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, S. Stevens, R.A. Flavell, Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease, *Immunity* 29 (6) (2008) 947–957.
- [95] P.R. Giacomini, R.H. Moy, M. Noti, L.C. Osborne, M.C. Siracusa, T. Alenghat, B. Liu, K.A. McCorkell, A.E. Troy, G.D. Rak, Y. Hu, M.J. May, H.L. Ma, L.A. Fouser, G.F. Sonnenberg, D. Artis, Epithelial-intrinsic IKK α expression regulates group 3 innate lymphoid cell responses and antibacterial immunity, *J. Exp. Med.* 212 (10) (2015) 1513–1528.
- [96] P. Aparicio-Domingo, M. Romera-Hernandez, J.J. Karrich, F. Cornelissen, N. Papazian, D.J. Lindenberg-Kortleve, J.A. Butler, L. Boon, M.C. Coles, J.N. Samsom, T. Cupedo, Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage, *J. Exp. Med.* 212 (11) (2015) 1783–1791.
- [97] A.V. Tumanov, E.P. Koroleva, X. Guo, Y. Wang, A. Kruglov, S. Nedospasov, Y.X. Fu, Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge, *Cell Host Microbe* 10 (1) (2011) 44–53.
- [98] P. Vacca, E. Montaldo, C. Vitale, D. Croxatto, L. Moretta, M.C. Mingari, MSC and innate immune cell interactions: a lesson from human decidua, *Immunol. Lett.* 168 (2) (2015) 170–174.
- [99] C. Carlino, H. Stabile, S. Morrone, R. Bulla, A. Soriani, C. Agostinis, F. Bossi, C. Mocchi, F. Sarazani, F. Tedesco, A. Santoni, A. Gismondi, Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy, *Blood* 111 (6) (2008) 3108–3115.
- [100] A.S. Cerdeira, A. Rajakumar, C.M. Royle, A. Lo, Z. Husain, R.I. Thadhani, V.P. Sukhatme, S.A. Karumanchi, H.D. Kopcow, Conversion of peripheral blood NK cells to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors, *J. Immunol.* 190 (8) (2013) 3939–3948.
- [101] P. Vacca, E. Montaldo, D. Croxatto, F. Loiacono, F. Canegallo, P.L. Venturini, L. Moretta, M.C. Mingari, Identification of diverse innate lymphoid cells in human decidua, *Mucosal Immunol.* 8 (2) (2015) 254–264.
- [102] T.F. Gajewski, H. Schreiber, Y.X. Fu, Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment, *Nat. Immunol.* 14 (10) (2013) 1014–1022.
- [103] Y. Hayakawa, H. Ariyama, J. Stancikova, K. Sakitani, S. Asfaha, B.W. Renz, Z.A. Dubeykovskaya, W. Shibata, H. Wang, C.B. Westphalen, X. Chen, Y. Takemoto, W. Kim, S.S. Khurana, Y. Taylor, K. Nagar, H. Tomita, A. Hara, A.R. Sepulveda, W. Setlik, M.D. Gershon, S. Saha, L. Ding, Z. Shen, J.G. Fox, R.A. Friedman, S.F. Konieczny, D.L. Worthley, V. Korinek, T.C. Wang, Mist1 expressing gastric stem cells maintain the normal and neoplastic gastric epithelium and are supported by a perivascular stem cell niche, *Cancer Cell* 28 (6) (2015) 800–814.
- [104] M.M. Shikhagaie, K. Gernar, S.M. Bal, X.R. Ros, H. Spits, Innate lymphoid cells in autoimmunity: emerging regulators in rheumatic diseases, *Nat. Rev. Rheumatol.* 13 (3) (2017) 164–173.
- [105] T. Cupedo, A.D. Stroock, M.C. Coles, Application of tissue engineering to the immune system: development of artificial lymph nodes, *Front. Immunol.* 3 (2012) 343.