

A zsír-asszociált nyirokszövetek szerkezeti jellemzői és szerepük a B-sejt limfóma hasüregi terjedésében

Xinkai Jia

PhD hallgató

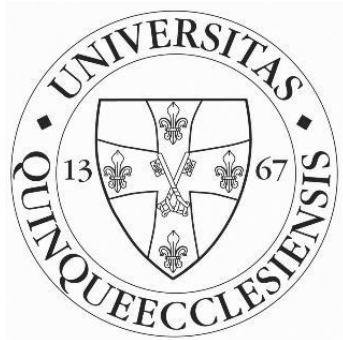
tudományos segédmunkatárs

Témavezető: **Dr. Balogh Péter**

Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet
Elméleti Orvostudományi Doktori Iskola



Pécs, 2022

Bevezetés

A bőr és a nyálkahártyák alkotják a szervezet első védelmi vonalát a kórokozók bejutásával szemben. A mikrobiális patogéneket ezeken a védelmi vonalakon történő átjutásuk után az immunrendszer sejtjei juttatják el a szomszédos másodlagos nyirokszövetekbe, ahol a fehérvérsejtek - a kórokozók megkötését követően - különböző típusú immunválaszokat alakítanak ki (1), (2).

A másodlagos nyirokszövetek (így a lép, nyirokcsomók és a Peyer-plakkok) a születés előtt fejlődnek ki. Ezen kívül a bélnyálkahártya védelmében részt vevő egyéb nyirokszöveti szerveződések, pl. a kriptoplakkok (CP) egy másik csoportot alkotnak, amik a születést követően alakulnak át izolált nyiroktüszővé (ILF) (3). Ezekkel a mostanra részletesen megismert nyirokszövetekkel szemben a savós hárttyák immunológiai védelme jórészt feltáratlan, bár ezen felületek számos hasüregi szervet borítanak be és nagy számban tartalmaznak B-1 B-sejteket (4).

Ugyan a zsírszövetek általánosan elfogadott élettani szerepe az energiaraktározás, számos kutatócsoport számolt be a zsírszövetekben előforduló nyirokszövetek helyi immunválaszok kialakításában játszott szerepéről (5–7). Ezekre a zsírszövetbe ágyazott nyirokszöveti struktúrákra a diffúz szerkezeti elrendeződés jellemző, amiben a fehérvérsejtek megtelepedését a CXCL1 és CXCL13 kemokinek segítik elő (5–8).

A cseplest (omentum) sebészi megfigyelések alapján régóta a hasüreg felügyelőjének tekintjük, ahol a tejfoltok (milky spot – MS) játsszák az elsődleges szerepet az immunológiai ellenőrzésben (9). A MS képletek gazdagon erezett, számos fehérvérsejtet tartalmazó struktúrák, amikben a B-1 sejtek természetes antitesteket termelnek (10–13). A közelmúltban ismerték fel a zsír-asszociált nyirokszöveti csoportosulásokat (fat-associated lymphoid clusters – FALC) amikben a 2. típusú veleszületett limfoid sejtek (ILC2) fontos szerepet játszanak a B-1 sejtek helyi osztódásában (14, 15).

A B-sejtek az adaptív immunitás kitüntetetten fontos résztvevői. Ennek részeként a B-1 sejtek nagy részben természetes antitesteket termelnek, míg a B-2 sejtek fontos szerepet töltenek be az antigén-prezentációban, immunszabályozásban és antigén-specifikus

ellenanyag-termelésben (16, 17). Az antigén-stimuláció mellett a B-sejt összetétel az egyén öregedése során is változik. Ennek következtében az öregedéshez kapcsolódó B-sejtek (age-associated B cells – ABC) jelennek meg, amik nagyszámú előfordulása jellemző az SLE-re hajlamos egerekben (16–20). A CD11c pozitív/T-bet^{high} ABC populáció a lép T/B zóna határterületén mutatható ki (21, 22). Fenotípusuk, genotípus-jellemzőik és klinikai jelentőségük miatt a B-sejt differenciálódás és antigén-stimulációt követő B-sejt alcsoportok megoszlásának vizsgálata fontos ismereteket nyújthat, és elősegítheti B-sejtes daganatok kórfolyamatainak a megértését is.

A cseplez MS és FALC területeiben nem csak fehérvérsejtek, hanem különböző daganatsejtek, így petefészek-tumor sejtek is felhalmozódhatnak áttétképzés során vagy hasüregi oltást követően (23–25). Ezen kívül a neutrofil granulociták által képzett neutrofil extracelluláris hálók (neutrophil extracellular traps - NETs) is kimutathatók a petefészek-daganatok premetasztatikus helyein, ami általában rossz prognózissal jár. Ezek a jelenléte a tumorsejtek, stromális összetevők és fehérvérsejtek közötti komplex kölcsönhatásra utal a tumor-növekedés során (26).

Korábbi munkánkban egy egerben kialakult spontán high-grade B-sejtes limfóma (Bc.DLFL1) vizsgálata során ezen sejtek nagyfokban korlátozott megtapadását és in vivo növekedését figyeltük meg a hasi nyirokcsomókban és a lépben. Kutatásaimban a Bc.DLFL1 sejtek és normál B-sejtek szerozális megtapadási helyeit azonosítottam, és vizsgáltam a zsírszöveti megtapadás során fellépő citokin-változásokat. Ennek során különböző hasüregi zsírszöveti területeken kimutattam egy új szerkezeti képlet, a leveles nyirokszövegi aggregátum (Foliate lymphoid aggregates – FLAg) jelenlétét. Emellett tanulmányoztam a Bc.DLFL1 sejtek eredetét. Tézisemben ezeknek az eredményeit foglalom össze, és további lehetséges kutatási irányokat mutatok be a szerozális limfocita-homeosztázis és daganat-megtapadás vizsgálatára.

Célkitűzés

A kutatásaink célja az alábbiak vizsgálata volt:

- A zsírszövet-asszociált nyirokszövetek típusai és szerkezeti jellemzői
- A Bc.DLFL1 és normál B-sejtek hasüregi-szerozális megtapadási folyamata;
- A Bc.DLFL1 sejtek jellemzőinek és eredetének meghatározása;
- A zsírszöveti alapállomány átalakulása a Bc.DLFL1 limfóma sejtek infiltrációja során.

Anyagok és módszerek

1. Egerek

8-10 hetes BALB/c és BALB/c^{eGFP} Tg egereket használtunk, amiket az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet SPF és konvencionális állatházában tartottunk fenn. A Prox-1-GFP riporter egereket Jakus Zoltás (SE) bocsájtotta rendelkezésünkre. A KikGR egereket (27) a Jackson Laboratories kolóniájából szereztük be. A Bc.DLFL1 sejteket a limfómás hasi nyirokcsomó szuszpenzió hasüregi oltásával tartottuk fenn (28). Az állatkísérletek az Állatkísérletes Tudományos Etikai Tanács (ÁTET) által kiállított engedélyek alapján történtek.

2. Áramlási citometria és szortolás

A Bc.DLFL1 és A20 limfoma sejteket fluorokrom-jelölt ellenanyagokkal inkubáltuk. Intracelluláris jelöléshez a sejtfelszíni markerekkel reagáló antitestekkel való inkubálást követően a sejteket fixáltuk és permeabilizáltuk, majd T-bet és Blimp-1 transzkripciósfaktorokkal szembeni antitestekkel inkubáltuk. A mintákat BD FACSCalibur és CellQuest Pro szoftver segítségével elemeztük.

Az IgV_H szekvenáláshoz a Bc.DLFL1 limfóma sejteket nagyság és granularitás (FSC/SSC) valamint B220 marker expresszió alapján Bio-Rad S3e szorterrel tisztítottuk, majd mRNS-t izoláltunk.

3. Bc.DLFL.1 Ig Vh szekvencia analízis

A tisztított Bc.DLFL1 sejtekből NucleoSpin RNA XS kittel teljes mRNS-t izoláltunk. Ezt követően High-Capacity cDNA Reverse Transcription kittel cDNS-t szintetizáltunk. A végpont PCR-t Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler berendezésen DreamTaq™ Green PCR Master Mix felhasználásával végeztük el. A PCR termékeket BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v1.1 kit felhasználásával AB 3500 Genetic analizátorral szekvenáltuk, és az IMGT/HighV-QUEST platformon elemeztük.

4. Whole-mount és szöveti immunhisztokémia és immunfluoreszcencia

Teljes bél whole-mount immunhisztológiai vizsgálatainkhoz a teljes bél komplexet (nyelőcsőtől a felszálló vastagbélig) 4%-of paraformaldehidben fixáltuk, majd 3 percig hematoxilinben festettük. Ezt követően a megfelelő bélfodor és cseplesz részeket mikrodisszekcióval izoláltuk. Immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a szövetmintákat 0,1% fenilhidrazin oldatban kezeltük, majd 5% borjú szérum albuminnal (BSA) telítettük. A mintákat különböző egér nyirokszöveti antigénekkal szembeni patkány monoklonális antitestekkel inkubáltuk, majd mosást követően a kötődést HRP-jelölt kecske anti-patkány antitesttel mutattuk ki diamino-benzidin (DAB)-H₂O₂ szubsztráttal. Immunfluoreszcens eljárás során különböző fluorokrómokkal jelölt patkány monoklonális antitesteket használtunk, a kötődést Olympus FluoView FV1000 LSC mikroszkóppal vizsgáltuk.

A hasi nyirokcsomókon végzett immunhisztokémiához Bc.DLFL1-oltott egerek mintáiból Leica CM1850 kriosztáttal 8 µm-es fagyasztott metszeteket készítettünk, majd azokat szárítás után hideg acetonnal fixáltuk. A metszetek fenilhidrazinos kezelése majd 5% BSA-telítése után különböző monoklonális antitestekkel inkubáltuk nedves kamrában. Mosást követően az antitestek kötődését HRP-konjugált kecske anti-patkány IgG-vel detektáltuk DAB-H₂O₂ szubsztráttal, hematoxylin magfestéssel kiegészítve. Kettős immunfluoreszcens jelöléshez FITC-konjugált és biotinált monoklonális antitesteket használtunk, utóbbit fikoeritrin-streptavidin (PE-StrAv) konjugátummal mutattuk ki.

GFP és gp38 kombinált kimutatásához a bélfodort paraformaldehid-fixálás után 30%-os szukróz-oldatban inkubáltuk. Fagyasztást követően 20 µm vastag metszetet készítettünk, majd száradás után PE-jelölt anti-gp38 antitesttel inkubáltuk. Mosás után a metszeteket Hoechst-33342 tartalmú 50%-os glicerinben fedtük, majd Olympus Fluoview FV-1000 LSC mikroszkópban vizsgáltuk.

5. Transzmissziós elektronmikroszkópia

Az eltávolított beleket és a bélfodor FLA_g képleteit 4%-of pufferolt paraformaldehidben fixáltuk, majd PBS-es mosást követően 2%-os glutáraldehidben utófixáltuk. Etanolos víztelenítés majd két órányi 1%-os ozmium-tetroxid kezelés után a mintákat Polybed/Araldit

6500 keverékkel beágyasztuk. Az 1 μm félvékony metszeteket toluidin-kékkel festettük. Az ultravékony metszeteket uranil-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztosítottuk és H-7600 Hitachi elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

6. Sejt jelölés és transzfer

A20 és Bc.DLFL1 (28) sejteket 5mM CFSE vagy 10mM CellTrace Far Red (CTFR) intracelluláris fluoreszcens festékekkel jelöltünk (29). BALB/c egér lépből FITC-jelölt anti-Thy-1/CD90 és anti-FITC paramágneses gyöngyökkel MACS eljárással depletáltuk a T-sejteket normál B-sejtek tisztításához. Infravörös közeli (NIR) fluoreszcenciához lipofil XenoLight DiR festéket használtunk. A festékek kimosása után a jelölt sejteket intraperitoneálisan oltottuk.

7. NIR fluoreszcens képalkotás

A MACS-tisztított B-sejteket vagy Bc.DLFL1 sejtek megtapadását XenoLight DiR jelölést és intraperitoneális oltást követően IVIS Lumina III képalkotó berendezéssel vizsgáltuk. A Bc.DLFL1 sejtek in vitro szövetei kötődését Bio-One CELLSTAR lemezen vizsgáltuk. Az adatokat Living Image programmal dolgoztuk fel és értékeltük.

8. KikGR fotokonverzió és kompetitív megtelepedés

A BALB/c alapra visszakeresztezett KikGR egérből eltávolított nyirokcsomókat szobahőmérsékleten fotokonvertáltuk (KikR), majd mechanikai úton feltártuk, és nem fotokonvertált (KikG) sejtekkel 1:1 (KikR/KikG) arányban elegyítettük, melyeket előzőleg anti-L-szelektin (MEL-14) monoklonális antitesttel kezeltünk. A sejt-keveréket a farokvénán keresztül intravénásan oltottuk (30).

9. Limfóma-hordozó egerek BAFF-receptor blokkoló kezelése

BALB/c egereket intraperitoneálisan oltottunk Bc.DLFL1 sejtekkel, majd 3 naponta 100 μg mBR3-Ig szolúbilis BAFF-receptorral, illetve kontrol egér IgG1 monoklonális antitesttel

oltottuk intravénásan (Genentech, USA). A kezelést a 18. napig folytattuk, miközben az állatok elhullását naponta ellenőriztük.

10. A Bc.DLFL1 sejtek in vitro tenyésztése és ZsGreen1 fluoroprotein lentivirális transzdukciója

Bc.DLFL1 sejteket 6-lyukú szövettenyésztő lemezekben peritoneális mosással eltávolított makrofágokra tettünk, majd 10% FCS, 2 mM GlutaMax és 5×10^{-5} M β -merkaptotanol hozzáadásával tenyésztettük.

Az EF1 α promotor által irányított ZsGreen1-kódoló, VSV-G-kifejező lentivirális vektor 20 MOI dózisban történő hozzáadásával a limfóma sejteket egy éjszakán keresztül fertőztük, majd a legintenzívebb zöld fluoreszcenciát mutató stabilan transzfektált 10%-nyi Bc.DLFL1^{ZsGreen1} populációt Bio-Rad S3e szorter segítségével izoláltuk és tenyésztettük in vitro.

11. A Bc.DLFL1^{ZsGreen1} limfóma sejtek in vivo nyirokszöveti megtapadása

A Bc.DLFL1^{ZsGreen1} sejteket intravénásan oltottuk, majd 12 órával később a sejtek megoszlását a lépben Alexa Fluor 647-jelölt anti-B220 és anti-MARCO antitestekkel vizsgáltuk fagyasztott lépmetsetek immunfluoreszcens jelölésével.

12. A limfómás szövetek citokin-termelésének vizsgálata és meghatározása multiplex R&D citokin-panel eljárással

A limfóma-hordozó és normál egerek cseplesz, bélfodor és hasi nyirokcsomó-mintáit Bc.DLFL1-hordozó, terminális állapotban lévő egerekből távolítottuk el, a szöveteket T-PER™ Tissue Protein Extraction reagenssel kezeltük proteáz-gátlók jelenlétében. A szövet-extraktumokkal Proteome profiler™ Array Mouse XL Cytokine Array Kit nitrocellulóz membránokat inkubáltunk a kit leírásának megfelelően. Az immunreaktivitás mértékét kemilumineszcens eljárással LAS 4000 berendezés és program segítségével határoztuk meg 180 másodperces expozíció során, az egyes intenzitásokat Image J programmal határoztuk meg. A normalizált adatkészleteket a pheatmap programcsomag segítségével ábrázoltuk.

13. Kvantitatív RT-PCR

Az ágyéki nyirokcsomókból, csepleszből és bélfodorból NucleoSpin használatával teljes mRNS-t tisztítottunk. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit segítségével cDNS-t készítettünk. A PNAd vázfehérjék és a MECA-79 glikoepitop kialakításában szereplő glikozilációs enzimek mRNS meghatározására a RT-PCR amplifikációt Applied Biosystems PRISM 7500 készüléken végeztük duplikátumban, SYBR Green primerek felhasználásával (31).

14. Statisztikai értékelés

A kapott adatokat SPSS 22.0 (IBM) segítségével értékeltük. Az adatok normáloszlását Shapiro–Wilks teszttel ellenőriztük. Normál mintaeloszlás esetében *t*-tesztet, nem normáloszlás esetében Mann–Whitney U-tesztet alkalmaztunk két csoport összehasonlítására. Az adatokat az átlag és \pm SEM formában ábrázoljuk. A *p* érték < 0.05 esetében tekintettük az egyes adatcsoportokat szignifikánsan eltérőnek.

A BAFF-R kezelés T/B megoszlásra kifejtett hatásának statisztikai értékelésére student's T-tesztet és GraphPad Prism 5 programot használtunk, ahol a statisztikailag szignifikáns különbségnek a *p* érték < 0.001 tekintettük. A hibasávok a standard átlag hibát jelzik. A Kaplan-Meier túlélési görbét GraphPad Prism 5 ($p < 0.01$) segítségével ábrázoltuk.

Eredmények

1. A FLAg képletek, mint a bélfodor nyirokvezetéséhez kapcsolódó új szerozális nyirokszöveti variánsok

A Bc.DLFL1 high-grade B-sejtes limfóma BALB/c egerekben a hasi nyirokcsomóra s lépre korlátozódó módon terjed. Nem ismert, hogy a korai megtapadás milyen szövetei összetevőket érint. Xenolight DiR-jelölt limfóma sejtek beadása után 4 órával megfigyeltük, hogy a cseplesz mutatja a legerősebb fluoreszcens szignált, míg kis fokális elrendeződést mutató jelforrások a bélfodor zsírszövetében is kimutathatók, a két jelforrás össz-intenzitása között nincs szignifikáns különbség. Meglepő módon a lépben és a hasi nyirokcsomóban nem volt korai megtapadáshoz köthető jelölődés. Whole-mount immunhisztokémiai eljárással a CFSE-jelölt limfóma-sejtek anti-FITC antitesttel történő kimutatása a NIR képalkotással nyert elrendeződéshez hasonló mintázatot mutatott. Tisztított normál B-sejtek hasüregi beoltása a Bc.DLFL1 limfóma sejtekhez hasonló megoszlást eredményezett.

Sztereomikroszkópos vizsgálatokkal a limfóma-kötő képletek között levélszerű képződményeket találtunk, amelyek vagy közvetlenül a bélfodor zsírszövetéhez, vagy egy nyél közvetítésével a hasüregi hashártya-tasakhoz (bursa omentalis) kapcsolódtak. Hasonló struktúrákat C57Bl/6J egerekben is azonosítottunk.

Immunhisztokémiai módszerekkel az egész FLAg területén intenzív CD45 kifejeződést figyeltünk meg, míg CD90/Thy-1.2 jelöléssel elsősorban a FLAg centrális részén volt kifejezett reaktivitás. Ezzel ellentétben whole-mount fénymikroszkópos immunhisztokémiai eljárással a B-sejtekre jellemző B220 kifejeződés egyenletes megoszlást mutatott. A FLAg képletek széli részében LYVE-1-pozitív makrofág-csoportosulásokat figyeltünk meg.

Kettős immunfluoreszcens jelöléssel konfokális mikroszkópos detektálással megerősítettük, hogy a T-sejtek a FLAg centrális részében, míg a B-sejtek a széli részben halmozódnak fel, ami megfelel a CCL21 és CXCL13 kifejeződési mintázatnak.

Elektronmikroszkópos feldolgozással a FLAg további részleteit figyeltük meg. Ezek alapján a FLAg képleteket egyrétegű mezotél sejtek fedik. Ez alatt a nagy denzitásban elhelyezkedő limfociták között elszórta plazmasejtek is jelen vannak, az alapállományt retikuláris sejtek és

dús kapilláris-hálózat alkotja. További immunfluoreszcens vizsgálatokkal kiterjedt fibronectin-hálózat találtunk a FLaG és nyél részekben egyaránt. VCAM-1 kifejeződést a nyelek mentén, valamint a FLaG centrális régiójában észleltünk. A zsírszövetekhez kapcsolódó FLaG kapilláris-hálózatának endotél sejtjei CD31 kifejeződést mutatnak, amihez szakaszos elrendeződésben PNA-d-pozitivitás társul. Ugyanakkor a nyirokendotél sejteket azonosító Prox-1 riportert egér FLaG képleteiben csak kevés elszórt GFP-pozitív sejtet találtunk. Ezek alapján a FLaG nem tartalmaz nyirokereket.

2. A limfociták hematogén megtapadása a szerozális nyirokszövetekben részben PNA-d-függő

Kikume GR egerekből tisztított limfocitákkal kompetitív homing tesztet végeztünk el. Megfigyeltük, hogy az L-szelektin blokkolására végzett MEL-14 antitest-kezelést követően a KikG+ limfociták megtapadása a perifériás nyirokcsomókban nagymértékben csökkent. Ehhez viszonyítva a bélfodorban kb. 50%-os gátlás-hatékonyságot találtunk. Ezt követően a pPCR vizsgálatok kimutatták a MECA-79 glikoepitop kialakításában résztvevő vázfehérjék és glikozilációs enzimek mRNS kifejeződését, ami lehetővé teszi a magas endoteliális venulákon (HEV) keresztüli fehérvérsejt-kilépést. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a szerozális nyirokszövetekbe történő limfocita-megtelepedés az érpályából részben az L-szelektin PNA-d-kötődésétől függő folyamat.

3. A Bc.DLFL1 sejtek szelektív megtelepedése a hasüregi szeroza felől a bélfodor nyirokereiben keresztül

CFSE-jelölt Bc.DLFL1 sejtek anti-FITC whole-mount immunhisztokémiai kimutatása megerősítette a jelölt sejtek megjelenését a bélfodor nyirokereiben. Hasonló eredményt kaptunk, amikor a vörös fluorokrom CTFR-jelölt limfóma sejteket a Prox-1-GFP nyirokér-jelölő konstrukciót kifejező transzgenikus egér hasüregébe oltottuk. Eredményeink szerint az oltást követően 4 órán belül a limfóma sejtek elérik a bél Prox-1-pozitív nyirokér-rendszerét.

4. A Bc.DLFL1 sejteken megjelenő intracelluláris és sejt felszíni markerek a limfóma sejtek ABC B-sejt alcsoportához való kapcsolódására utalnak.

Korábbi eredményeink alapján a Bc.DLFL1 sejtek CD19, B220, MHC-II és MAC-1 (CD11b/CD19) markereket hordoznak, ugyanakkor nem fejezik ki a CD21 és CD23 markereket. Ezt követően azt találtuk, hogy a sejtek CCR7 receptort és CXCR4 receptort is kifejeznek, ami eddigi ismeretek alapján a CD11c markert kifejező időskori B-sejtek (age-associated B cell – ABC) egyik jellemző sejt felszíni molekulája (20). Az elvégzett áramlási citometriás vizsgálatok igazolták a CD11c megjelenését a limfóma sejteken. Irodalmi adatok alapján a T-bet transzkripció faktor kifejeződése az ABC populációra jellemző (18, 20, 32). Igazoltuk, hogy a Bc.DLFL1 sejtek kifejezik a T-bet és Blimp-1 transzkripció faktorokat. Ugyanakkor a plazmasejtekre jellemző CD138 nem mutatható ki, bár az ABC populációban fokozott CD80 és CD86 aktivációs markerek kifejeződését a Bc-DLFL1 sejteken is megfigyeltük.

A limfóma sejtek Ig gén V_H régiójában 11 aminosav-váltással járó és egy "silent" mutációt találtunk. A sejt vonal által termelt immunglobulin az IgG2a osztályba tartozik, ami igazolja a nehéz lánc izotípus-váltását. Ezek az adatok együttesen alátámasztják, hogy a Bc.DLFL1 limfóma ABC-eredetű plazmablasztból származhat, aminek a nem teljes plazmasejt érési stádiumát a Blimp-1 kifejeződés és IgG2a immunoglobulin termelése igazolja, a CD138 kifejeződése nélkül.

5. A Bc.DLFL1 sejtek a lép extrafollikuláris területeiben halmozódnak fel.

Előzetes eredményeink a Bc.DLFL1 sejtek extrafollikuláris megtelepedési preferenciáját vetették fel. A limfóma sejtek érzékeny nyomkövetéséhez létrehoztuk az intenzív zöld fluoreszcenciát mutató Bc.DLFL1^{ZsGreen} sejteket. A Bc.DLFL1^{ZsGreen} sejtek intravénás oltását követő 12 óra múlva a zöld sejtek túlnyomó része a fehér pulpa extrafollikuláris részében, valamint azt a vörös pulpától elválasztó marginális zónában helyezkedik el.

6. BAFF-R gátlás fokozza a limfóma-hordozó egerek túlélését.

A BAFF (B-sejt aktiváló faktor) fontos szerepet tölt be az érett B-sejtek túlélésében, ezért vizsgáltuk a Bc.DLFL1 limfóma sejtek BAFF-receptor (BAFF-R) és analógjainak (BCMA és TACI) kifejeződését. Eredményeink alapján a BAFF-R TACI fokozott expressziót mutat, míg a BCMA kifejeződésének mértéke nem tér el a normál B-sejtekhez viszonyítva.

A továbbiakban vizsgáltuk a BAFF-R szerepét a tumor progressziójában, aminek során szolúbilis BAFF-R kompetitor mBR3-Fc fúziós fehérjét oltottunk intravénásan a tumor oltását követően az 1, 4, 6 és 8. napokon. Kontrollként normál egér IgG1 oldatot alkalmaztunk. A 18. napra a gátlószerrel kezelt állatok túlnyomó többsége túlélte, míg a kontroll IgG1 oldattal kezelt állatok nagyobb része elpusztult. Ezen adatok alapján a mBR3-Fc hatására bekövetkező BAFF-R funkció gátlása szignifikáns mértékben javítja a limfóma-hordozó állatok túlélését.

7. A stroma-összetevők változásai és szövet-specifikus citokin-megoszlás

A limfómás hasi zsírszövetek anti-B220 és anti-Ki-67 immunhisztokémiai vizsgálatai megerősítették, hogy a tumor előrehaladott szakaszában a B-sejtes limfóma kitölti a bélfodor és cseplesz zsírszövetét. Emellett eGFP transzgenikus recipiens egerekben a limfómás régiók gp38⁺/eGFP⁺ FRC hálózatot tartalmaznak, míg nem oltott egerekben ezek a sejtek tipikusan az erek környezetére korlátozottan helyezkednek el. A hasi nyirokcsomók, cseplesz és bélfodor citokin-összetételének összehasonlítása normál és limfóma-hordozó egérben 12 citokin fokozott termelődését mutatta ki mindhárom szövetben, míg a csepleszben és a bélfodorban 38 azonos citokin termelődése fokozódott.

A PhD kutatásaim során elért új eredmények:

1. Új nyirokszövet-variáns (FLAg) létezését mutattuk ki, amik részlegesen kompartmentalizált szerkezettel rendelkeznek, és amik egy testből és egy, a testet (a cseplesz és bélfodor zsírszövetéhez, vagy hashártyához) rögzítő nyélből állnak;
2. Kimutattuk, hogy a B-sejtek és Bc.DLFL1 high-grade limfóma sejtek hasüregből FLAg irányába történő vándorlásuk során a LYVE-1 pozitív makrofágokhoz kapcsolódnak, míg a vérpályából részben L-szelektin-függő módon lépnek ki;
3. Igazoltuk, hogy különböző B-sejtes limfóma sejtek a FLAg képleteken belül kemokin-receptor mintázatuknak megfelelően kompartmentalizálódnak, a CCR7 közreműködésével a Bc.DLFL1 sejtek a CCL21-képző centrális rész felé, míg a CXCR5-hordozó A20 sejtek a CXCL13-tartalmú perifériás övezet felé vándorolnak;
4. Kimutattuk, hogy a bélfodor nyirokkapillárisai a hasüregbe oltott B-sejtek kilépési útvonalának részét képezik;
5. Igazoltuk, hogy a FLAg-test VCAM-1-pozitív fibroblasztok körül rendeződik el, és kiterjedt CD31-pozitív érhálózatot tartalmaz;
6. A Bc.DLFL1 limfóma sejteket T-bet, CD11c és CXCR4 kifejeződésük alapján időskori (age-associated B cell – ABC) B-sejt származékként azonosítjuk, amiket a CCR7 és CXCR4 a lép T-sejt zóna, illetve a marginális zóna és a vörös pulpa felé irányít;
7. Kimutattuk, hogy a Bc.DLFL1 limfómával oltott egerek túlélését a BAFF-R ligand-kötésének gátlása szignifikánsan javítja;
8. Megállapítottuk, hogy a Bc.DLFL1 sejtek zsírszöveti kiterjedése szövet-specifikus módon megváltoztatja a helyi citokin-mintázatot, és elősegíti a gp38-pozitív retikuláris fibroblasztok expanszióját.

Hivatkozások

1. Comes, J. S. 1965. Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches. *Gut* 6: 225–229.
2. Liu, X., Y. Zhao, and H. Qi. 2022. T-independent antigen induces humoral memory through germinal centers. *J. Exp. Med.* 219.
3. 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.
4. Ansel, K. M., R. B. S. Harris, and J. G. Cyster. 2002. CXCL13 Is Required for B1 Cell Homing, Natural Antibody Production, and Body Cavity Immunity. *Immunity* 16: 67–76.
5. Meza-Perez, S., and T. D. Randall. 2017. Immunological Functions of the Omentum. *Trends Immunol.* 38: 526–536.
6. Cruz-Migoni, S., and J. Caamaño. 2016. Fat-associated lymphoid clusters in inflammation and immunity. *Front. Immunol.* 7.
7. Jackson-Jones, L. H., P. Smith, J. R. Portman, M. S. Magalhaes, K. J. Mylonas, M. M. Vermeren, M. Nixon, B. E. P. Henderson, R. Dobie, S. Vermeren, L. Denby, N. C. Henderson, D. J. Mole, and C. Bénézech. 2020. Stromal Cells Covering Omental Fat-Associated Lymphoid Clusters Trigger Formation of Neutrophil Aggregates to Capture Peritoneal Contaminants. *Immunity* 52: 700–715.e6.
8. Bénézech, C., E. Mader, G. Desanti, M. Khan, K. Nakamura, A. White, C. F. Ware, G. Anderson, and J. H. Caamaño. 2012. Lymphotoxin- β Receptor Signaling through NF- κ B2-RelB Pathway Reprograms Adipocyte Precursors as Lymph Node Stromal Cells. *Immunity* 37: 721–734.
9. Hall, J. C., K. A. Heel, J. M. Papadimitriou, and C. Platell. 1998. The pathobiology of peritonitis. *Gastroenterology* 114: 185–196.
10. Fedorko, M. E., and J. G. Hirsch. 1971. Studies on transport of macromolecules and small particles across mesothelial cells of the mouse omentum: I. Morphologic aspects. *Exp. Cell Res.* 69: 113–127.
11. Gerber, S. A., V. Y. Rybalko, C. E. Bigelow, A. A. Lugade, T. H. Foster, J. G. Frelinger, and E. M. Lord. 2006. Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am. J. Pathol.* 169: 1739–1752.
12. Hodel, C. 1970. Ultrastructural studies on the absorption of protein markers by the greater omentum. *Eur. Surg. Res.* 2: 435–449.
13. Avrameas, S., and T. Ternynck. 1995. Natural autoantibodies: The other side of the immune system. *Res. Immunol.* 146: 235–248.
14. Bénézech, C., N. T. Luu, J. A. Walker, A. A. Kruglov, Y. Loo, K. Nakamura, Y. Zhang, S. Nayar, L. H. Jones, A. Flores-Langarica, A. McIntosh, J. Marshall, F. Barone, G. Besra, K. Miles, J. E. Allen, M. Gray, G. Kollias, A. F. Cunningham, D. R. Withers, K. M. Toellner, N. D. Jones, M. Veldhoen, S. A. Nedospasov, A. N. J. McKenzie, and J. H. Caamaño. 2015. Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. *Nat. Immunol.* 16: 819–828.
15. Moro, K., T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J. I. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii, and S. Koyasu. 2010. Innate production of TH 2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit+ Sca-1+ lymphoid cells. *Nature* 463: 540–544.
16. Kugler-Umana, O., P. Devarajan, and S. L. Swain. 2020. Understanding the Heterogeneous Population of Age-Associated B Cells and Their Contributions to Autoimmunity and Immune Response to Pathogens. *Crit. Rev. Immunol.* 40: 297–309.
17. Baba, Y., Y. Saito, and Y. Kotetsu. 2020. Heterogeneous subsets of B-lineage regulatory cells (Breg cells). *Int. Immunol.* 32: 155–162.
18. Hao, Y., P. O'Neill, M. S. Naradikian, J. L. Scholz, and M. P. Cancro. 2011. A B-cell subset uniquely responsive to innate stimuli accumulates in aged mice. *Blood* 118: 1294–1304.
19. Rubtsov, A. V., K. Rubtsova, A. Fischer, R. T. Meehan, J. Z. Gillis, J. W. Kappler, and P. Marrack. 2011. Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c+ B-cell population is important for the development of autoimmunity. *Blood* 118: 1305–1315.
20. Cancro, M. P. 2020. Age-Associated B Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 38: 315–340.
21. Rubtsov, A. V., K. Rubtsova, J. W. Kappler, J. Jacobelli, R. S. Friedman, and P. Marrack. 2015. CD11c-Expressing B Cells Are Located at the T Cell/B Cell Border in Spleen and Are Potent APCs. *J. Immunol.* 195: 71–79.
22. Johnson, J. L., R. L. Rosenthal, J. J. Knox, A. Myles, M. S. Naradikian, J. Madej, M. Kostiv, A. M. Rosenfeld, W. Meng, S. R. Christensen, S. E. Hensley, J. Yewdell, D. H. Canaday, J. Zhu, A. B. McDermott, Y. Dori, M. Itkin, E. J. Wherry, N. Pardi, D. Weissman, A. Najj, E. T. L. Prak, M. R. Betts, and M. P. Cancro. 2020. The Transcription Factor T-bet Resolves Memory B Cell Subsets with Distinct Tissue Distributions and Antibody Specificities in Mice and Humans. *Immunity* 52: 842–855.e6.
23. Clark, R., V. Krishnan, M. Schoof, I. Rodriguez, B. Theriault, M. Chekmareva, and C. Rinker-Schaefter. 2013. Milky spots promote ovarian cancer metastatic colonization of peritoneal adipose in experimental models. *Am. J. Pathol.* 183: 576–591.
24. Liu, J., X. Geng, and Y. Li. 2016. Milky spots: omental functional units and hotbeds for peritoneal cancer metastasis. *Tumor Biol.* 37: 5715–5726.
25. Kasagi, Y., Y. Harada, Y. Morodomi, T. Iwai, S. Saito, K. Yoshida, E. Oki, H. Saeki, K. Ohgaki, M. Sugiyama, M. Onimaru, Y. Maehara, and Y. Yonemitsu. 2016. Peritoneal dissemination requires an Sp1-dependent CXCR4/CXCL12 signaling axis and extracellular matrix-directed spheroid formation. *Cancer Res.* 76: 347–357.
26. Lee, W. J., S. Y. Ko, M. S. Mohamed, H. A. Kenny, E. Lengyel, and H. Naora. 2019. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum. *J. Exp. Med.* 216: 176–194.
27. Nowotschin, S., and A. K. Hadjantonakis. 2009. Use of KikGR a photoconvertible green-to-red fluorescent protein for cell labeling and lineage analysis in ES cells and mouse embryos. *BMC Dev. Biol.* 9.
28. Vojkovic, D., Z. Kellermayer, D. Heidt, M. Mihaj, B. Kajtar, D. Ernst, T. Kovacs, P. Németh, and P. Balogh. 2016. 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.* 22: 421–430.
29. Zhou, W., H. C. Kang, M. O'Grady, K. M. Chambers, B. Dubbels, P. Melquist, and K. R. Gee. 2016. CellTrace™ Far Red & CellTracker™ Deep Red. *J. Biol. Methods* 3: e38.
30. Chin, S. S., L. Chorro, J. Chan, and G. Lauvau. 2019. Splenic innate B1 B cell plasmablasts produce sustained granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 cytokines during murine malaria infections. *Infect. Immun.* 87.
31. Czömpöly, T., Á. 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.
32. Rubtsova, K., A. V. Rubtsov, J. M. Thurman, J. M. Mennona, J. W. Kappler, and P. Marrack. 2017. B cells expressing the transcription factor T-bet drive lupus-like autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 127: 1392–1404.

Publikációs lista

A Doktori tézisem az alábbi közleményekre épül:

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

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

Jia, X., J. Bene, N. Balázs, K. Szabó, G. Berta, R. Herczeg, A. Gyenesei, and P. Balogh. Age-Associated B Cell Features of the Murine High-Grade B Cell Lymphoma Bc.DLFL1 and Its Extranodal Expansion in Abdominal Adipose Tissues. *J Immunol.* 2022 208:2866-2876. ** (IF: 5,422)

A munkához kapcsolódó egyéb közlemények:

Ritter Z, Zámbo K, Jia X, Szöllősi D, Dezső D, Alizadeh H, Horváth I, Hegedűs N, Tuch D, Vyas K, Balogh P, Máthé D, Schmidt E. Intraperitoneal Glucose Transport to Micrometastasis: A Multimodal In Vivo Imaging Investigation in a Mouse Lymphoma Model. *Int J Mol Sci.* 2021 22:4431. (IF: 5,923)

Ritter Z, Zámbo K, Balogh P, Szöllősi D, Jia X, Balázs Á, Taba G, Dezső D, Horváth I, Alizadeh H, Tuch D, Vyas K, Hegedűs N, Kovács T, Szigeti K, Máthé D, Schmidt E. In situ lymphoma imaging in a spontaneous mouse model using the Cerenkov Luminescence of F-18 and Ga-67 isotopes. *Sci Rep.* 2021 11:24002. (IF: 4,379)

Egyéb közlemények

Khanfar E, Olasz K, Gajdócsi E, Jia X, Berki T, Balogh P, Boldizsár F. Splenectomy modulates the immune response but does not prevent joint inflammation in a mouse model of RA [published online ahead of print, 2022 May 16]. *Clin Exp Immunol.* 2022;uxac052. doi:10.1093/cei/uxac052 (IF: 5,732)

*A számban a Top Reads közé sorolt közlemény (<https://www.jimmunol.org/content/204/1/1>)

**A *J Immunol* 2022 június 15-i szám címlap-képe (<https://www.jimmunol.org/content/208/12.cover-expansion>)

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak a személyeknek, akik az életemben megjelentek, hogy segítettek azzá lennem, aki vagyok, és különösképpen azoknak akik álmaim követésére bátorítottak.

Szeretném hálámat kifejezni témavezetőmnek, Dr. Balogh Péternek, aki támogatta az itteni tartózkodásomat és a PhD tanulmányaim során végig irányított.

Külön köszönettel tartozom Dr. Kellermayer Zoltánnak és Dr. Gábris Fanninak a kísérletek során nyújtott technikai tanácsaikért.

Hálás vagyok Dr. Berta Gergelynek a konfokális képek elkészítéséért és Dr. Herczeg Róbertnek és Dr. Gyenesei Attilának a hőterképes adatelemzésért.

Köszönettel tartozom az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden dolgozójának.

Köszönöm családomnak, hogy támogattak azzal, hogy utamra engedtek, és tisztelték döntéseimet.