dc_1678_19

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Az egér perifériás nyirokszövetek vaszkuláris-stromális elemeinek differenciálódása és szerepe a limfoid sejtek homeosztázisában

Dr. Balogh Péter

Pécsi Tudományegyetem
Klinikai Központ
Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

2020

dc_1678_19

TARTALOM

1. Előszó: A perifériás nyirokszövetek limfoid és nem-hematopoetikus összetevőinek kapcsolt differenciálódása és kölcsönös függése 9

Rövidítések jegyzéke 11

2. Bevezetés: A perifériás nyirokszövetek kialakulásának fejlődésbiológiai áttekintése 15

2.1. A nyirokszöveti területriumok embrionális indukciójának celluláris partnerei: inducer és organizátor sejtek 15

2.1.1. Az LTi sejtek korai stromális partnerei: LTo populáció(k) 16

2.1.2. Az LTi és LTo sejtek fejlődéstani jellemzői 16

2.1.3. A perifériás nyirokszövetek fejlődésében résztvevő főbb morfogén faktorok 18

2.1.4. TNF/LT ligandok és receptoraik – részleges átfedés és komplementaritás .. 19

2.1.5. A perifériás nyirokszervek fejlődésének citokin/kemokin szabályozása... 22

3. A lép fejlődésének főbb jellemzői 27

3.1. A lép alapvető strukturális összetevői emberben és egérben 27

3.2. A lép korai fejlődésének transzkripcionális szabályozása 31

3.3. A lép előtelep kialakulása, a vörös pulpa és a fehér pulpa elkülönülése 33

4. Célkitűzések 37

5. Fontosabb módszerek 39

5.1. Monoklonális antitestek előállítása, immunglobulin tisztítás és jelölés 39

5.2. Immunhisztológiai vizsgálatok 39

5.3. Áramlási citometria 39

5.4. Monoklonális antitestek reaktivitásának és epitóp-specificitásának meghatározása 40

5.5. Egerek genotipizálása és mRNS kifejeződésének qPCR vizsgálata 40

5.6. Adoptív sejt-transzfer, hematopoetikus kimérák és *in vivo* jelölés..... 40

6. Eredmények..... 43

6.1. Új monoklonális antitestek fejlesztése és alkalmazása az egér perifériás nyirokszövetek stromális elemeinek azonosítására 43

6.2. A lép retikuláris fibroblasztjainak fejlődéstani és regionális heterogenitása 47

6.2.1. A lép fehér pulpa retikuláris fibroblaszt-váz szerkezeti és fejlődési jellemzői..... 47

6.2.2. A lép fehér pulpa retikuláris fibroblaszt-váz kompartmentalizáció limfocita-függése..... 47

6.3. Az egér lép vaszkuláris elemeinek szerkezeti elkülönülése és fejlődéstani jellemzőik 51

6.3.1. A lép érhálózatának endotél-altípusai sejtfelszíni fenotípusuk alapján.... 52

6.3.2. A lép érhálózatának differenciálódása és kompartmentalizációja 52

6.4. A lép follikuláris dendritikus sejtjeinek érése és öregedéssel kapcsolatos funkcionális károsodása 55

6.4.1. Az FDC fenotípus és funkció főbb jellemzői egér lépben 55

6.4.2. FDC-markereket hordozó sejtek megjelenése és megoszlása..... 55

6.4.3. Az FDC előalakok γ-irradiáció-rezisztens érése 56

6.4.4. Az FDC fenotípus változása csíracentrum reakció során..... 57

6.4.5. Öregedéshez kapcsolt hanyatlás: Az FDC-k csökkent CD21L retenciója és csökkent FcγRII/RIII expressziója az FDC-t nem-stimulátor partnerré alakítja a csíracentrum reakcióban 58

6.5. A lép MZ makrofágok, MZ B-sejtek és FDC szerepe a MARCO scavenger receptor follikuláris conduit-rendszerhez kapcsolt felhalmozódásában 60

6.5.1. A lép marginális zóna és nyiroktüsző közötti kommunikáció molekuláris és sejtes összetevői 60

6.5.2. A nyiroktüsző MARCO-pozitív csatornarendszer szerkezeti jellemzői és az FDC hálózat szerepe a MZ MARCO akkumulálásában 61

6.5.3. A MARCO follikuláris eljuttatásához a B-sejtek nyiroktüsző-képzése szükséges a MZ B-sejt áthelyeződésétől függetlenül 65

6.6. A LTβR szignalizáció és az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor eltérő szerepe az egér lép érmintázatának kialakításában 67

6.6.1. A lép érpályáinak fontosabb szabályzói 67

6.6.2. A LTβR újszülöttkori gátlása a marginális szinusz fejlődésének gátlását váltja ki 68

6.6.3. A NF-κB komplex RelB, p50 és p52 tagjainak eltérő szerepe a marginális szinusz képződésében 71

6.6.4. Az Nkx2-3 hiánya a vörös pulpa vaszkuláris atrófiáját indukálja 71

6.7. Az Nkx2-3 transzkripciós faktor szabályozza az egér lép érpálya-mintázatát és limfocita homing folyamatát 74

6.7.1. Az Nkx2-3 hiányának hatása a HEV-fejlődéshez/funkcióhoz kapcsolódó gének kifejeződésére a lépben 74

6.7.2. Ektópiás HEV-szerű erek képződése az Nkx2-3$^{-/-}$ mutáns lépben 75

6.7.3. A fehérvérsejtek megtelepedése az Nkx2-3$^{-/-}$ lépben a CCL21-termelő HEV-képletekben L-szelektin-függő módon történik 80

6.7.4. A hematogén úton belépő kórokozók csökkent megkötése Nkx2-3$^{-/-}$ egerek lépében 82

6.7.5. Az Nkx2-3$^{-/-}$ lép ektópiás HEV-ek posztnatális fejlődése és LTβR függése .. 83

6.7.6. LYVE-1^{+} endotél tasakok képződése Nkx2-3-hiányos egér lépében 88

6.7.7. A nyirokendotél-asszociált mRNS megosztott kifejeződése 88

6.7.8. A LYVE-1^{+} tasakok limfocita-tartalma és stromális mikrokörnyezete 90

6.7.9. A LYVE-1^{+} tasakok korlátozott limfocita-felvétele 91

6.7.10. A LYVE-1^{+} tasakok fejlődése az embrionális fejlődés során kezdődik, és nem igényel LTβR aktivációt 91

6.8. Az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor hiánya átprogramozza a Peyer-plakkok limfocita homingban résztvevő endoteliális addresszin preferenciáját .. 94

6.8.1. A HEV-re jellemző gének mRNS kifejeződésének nyirokcsomó-szerű mintázatváltása Nkx2-3-hiányos felnőtt egerekben 95

6.8.2. A bél-asszociált nyirokszövetek HEV endotél és limfocita összetétel vizsgálata Nkx2-3 deficiens egérben 96

6.8.3. A bél limfoid homing során a PNAd^{+} HEV-ek kilépési kapuként működnek Nkx2-3$^{-/-}$ egérben..... 100

6.8.4. A PP homing in vivo gátlása anti-PNAd antitesttel Nkx2-3 mutáns egerekben 103

6.8.5. Az Nkx2-3 mutáns PP HEV posztnatális MAdCAM-1→PNAd váltáshoz limfotoxin szignalizáció szükséges, és a folyamatot érett T- és B–sejtek fokozzák 104

6.9. Az Nkx2-3 szerepe kísérletes vastagbélgyulladás kiváltásában..... 108

6.9.1. Gátolt ILF érés az Nkx2.3$^{-/-}$ egér vastagbelében 109

6.9.2. Az Nkx2-3 hiányos egerek védettek a DSS-indukált bélgyulladással szemben..... 111

6.9.3. Az Nkx2-3 hiánya megváltoztatja a vastagbél RORγt^{+} limfoid sejt és regulátor T-sejt megoszlását és jellemző citokin-termelődését 114

6.9.4. Az Nkx2-3 hiányos egerek DSS-indukált bélgyulladástól való védettsége a bélhám-sejtek IL-22 termeléstől független fokozott osztódásához kapcsolódik 116

6.9.5. Nkx2-3 hiányos egerek vastagbélgyulladással szembeni védelmét a nem-hematopoetikus sejtek közvetítik..... 117

6.10. Az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor szerepe a 3. típusú veleszületett limfoid sejtek (ILC3) posztnatális sejtmegoszlásának szabályozásában a bél-asszociált nyirokszövetekben 121

6.10.1. Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányban megváltozik a születés utáni ILC3 megoszlás a bélben 122

6.10.2. A SILT érésének eltérései Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányában..... 123

6.10.3. A PNAd vázfehérjék és modifikáló enzimek mRNS kifejeződése MAdCAM-1 mutáns Peyer plakkokban..... 126

6.10.4. A nyálkahártya ILC3 megoszlás és az ér-addresszin regionális kifejeződésének korrelációja..... 128

6.11. Nkx2-3$^+$ endoteliális és kötőszöveti komponensek azonosítása és jellemzése humán lépben és vastagbélben 130

6.11.1. A humán lép Nkx2-3$^+$ ér-szegmentumainak szöveti és fenotípusbéli jellemzői..... 130

6.11.2. A humán vastagbél Nkx2-3$^+$ kötőszöveti összetevőinek szöveti és fenotípusbéli jellemzői 132

6.12. Az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor onkogén szerepének vizsgálata B-sejtes malignus limfómákban 133

6.12.1. Az Eμ-NKX2.3 Tg egerek B-sejtes limfoproliferációjának jellemzői..... 133

6.13. Szerozális limfocita-dús aggregátumok, mint részlegesen struktúrált viszcerális nyirokszöveti összetevők szerepe B-sejtek és diffúz nagy B-sejtes limfóma hasűri nyirokszöveti terjedésében 136

6.13.1. A Bc.DLFL1 limfóma immunfenotípusa és in vivo terjedési jellemzői .. 136

6.13.2. A Bc.DLFL1 limfóma korai szelektív megtapadása szerozális limfoid nyirokszövetekben 139

6.13.3. FLAg: részlegesen kompartmentalizált új nyirokszöveti variáns 143

6.13.4. A FLAg egyes komponenseinek szerepe a limfoid sejtek felületi és vaszkuláris megtapadásában 147

7. Összefoglalás és megbeszélés..... 151

8. Új eredmények..... 157

9. A dolgozat alapját adó publikációk 159

9.1 A témában megjelent további közlemények 160

9.2 Tudománymetriai adatok 161

10. Köszönetnyilvánítás..... 163

11. Irodalomjegyzék..... 165

12. Mellékletek..... 183

Az értekezés alapját képező közlemények..... 183

1. ELŐSZÓ: A PERIFÉRIÁS NYIROKSZÖVETEK LIMFOID ÉS NEM-HEMATOPOETIKUS ÖSSZETEVŐINEK KAPCSOLT DIFFERENCIÁLÓDÁSA ÉS KÖLCSÖNÖS FÜGGÉSE

A humán immunrendszer szövetei és szervei az egész szervezetre kiterjedő hálózatot alkotnak. Ezek az immunkompetens területek elsősorban fehérvérsejtekből állnak, amelyek a külső és belső kórokozók különböző módokon történő felismerésére, majd ezt követően ezek elpusztítására specializálódtak. Ezeknek a sejtes kölcsönhatásokon alapuló folyamatoknak a helyszínéül a perifériás/másodlagos nyirokszövetek szolgálnak, míg a centrális/elsődleges nyirokszövetek szerepe a patogén-felismerő fehérvérsejtek túlnyomó részének termelése.

A gerincesek között az emlősökben találjuk a perifériás nyirokszövetek legszélesebb spektrumát. Bár általános immunológiai szerepük és némiképp alapvető szöveti szerkezetük is nagymértékben hasonló, az emlős nyirokszövetek fejlődéstani útvonalai és pontos szöveti specifikációik jelentősen különböznek. Ezen fejlődési különbségek a kifejlett szervek/szövetek között többféleképpen jelentkeznek – így eltérő számosság (egy lép, néhány/tucatnyi Peyer-plakk, több száz nyirokcsomó), különbségek a méretben, a megjelenés időpontjában, az érett T- és B-sejtes kolonizációs mechanizmusában és kinetikájában, vagy antigén-felvételi folyamataikban. Ugyanakkor a sejtes összetétel és szöveti elrendeződés általános jellemzőinek hasonlóságai egy mélyen beágyazott és közös elv szerint meghatározott mintázatot tükröznek, amelyek a prenatális („steril") és a mikrobák által kiváltott posztnatális nyirokszövet-szerveződés (limfoid neogenezis) során egyaránt megfigyelhetők. Így elméleti szempontból feltételezhetjük, hogy a potenciális nyirokszöveti területek a szekunder nyirokszöveteknek az egyedfejlődés során manifesztálódó *de facto* területein helytől és állapottól függően túlterjedhet, ugyanakkor ezek gyakorlati szempontból a jelenlegi képalkotó diagnosztikus és biopsziás eljárások számára túlnyomórészt hozzáférhetetlenek. Így a multicelluláris immunkompetens nyirokszövetek fejlődéstanilag szabályzott kialakulásának kutatása a kóros ektópiás nyirokszövetek létrejöttének jobb megértéséhez, ezáltal klinikailag közvetlenül is értékelhető új terápiás stratégiák kialakításához is hozzásegíthet.

Spontán vagy célzott mutációk révén a limfocita-fejlődésben különböző módokon gátolt egereken végzett megfigyelések alapján jelentős felismerés volt, hogy a perifériás nyirokszövetek embrionális differenciálódásának kiváltása az érett T- és B-sejtek jelenlététől, valamint külső antigénektől egyaránt független. Így azt fejlődéstanilag ugyanannyira „megelőlegező" jellegű eseménynek tekinthetjük, mint a külső antigéneket felismerő antigén-receptort hordozó limfociták primer nyirokszövetekben végbemenő antigén-independens fejlődését. Így a perifériás nyirokszövetekké fejlődő anatómiai régiók létrejötte megelőzi ezen szöveteknek a limfocita-tárolásban és az adaptív immunválasz fenntartásában játszott szerepükkel szembeni aktuális igények megjelenését. Fontos megjegyezni, hogy az immunrendszernek a másodlagos

nyirokszövetekre jellemző, nagymértékben komplex szerkezetű (a gyulladásos infiltráció mértékét meghaladó) harmadlagos/ektópiás nyirokszöveteknek nevezett multicelluláris szerveződéseket kialakító képessége a születés után is fennmarad. Bár ez a *de novo* indukciós esemény túlnyomórészt antigén-stimulált limfociták részvételével valósulhat meg, hasonló folyamat B-sejtes follikuláris limfomák expanziójában is megfigyelhető, aminek fontos szerepe van a mikrokörnyezetnek a tumor növekedését lehetővé tevő nyiroktüsző-szerű átalakulásában.

A perifériás nyirokszöveteket hagyományosan az adott szöveti részletet dominánsan kitöltő limfocita-típus alapján osztjuk fel régiókra (kompartmentekre). Így a nyiroktüszőket B-sejtes kompartmentnek tekintjük, míg a lép centrális arteriola körüli része és a nyirokcsomók kérgi területe, valamint a Peyer-plakkok nyiroktüszők közötti részletei a T-sejtes régiókat alkotják.

A tömeges helyi limfocita-jelenlét ugyanakkor nem fedheti el, hogy ugyanezen regionális elkülönülés nem csak a (mobilis) limfocita-alcsoportok megoszlásában, hanem az azokat körülvevő (szesszilis) mikrokörnyezeti-kötőszöveti komponensek, valamint az adott területet ellátó érszakaszok elrendeződésében is megnyilvánul. Így a nyiroktüszők nem-hematopoetikus szerkezeti összetevői elsősorban a B-sejtek akkumulálódását elősegítő, és a T-dependens humorális immunválasz során történő expanziójukat támogató follikuláris dendritikus sejtek, míg a T-sejtek mikrokörnyezetét főként retikuláris fibroblasztok alkotják. Mindkét nem-hematopoetikus sejt-csoport fontos szerepet tölt be az adott területre jellemző limfocita populáció túlélésében, ugyanakkor érésük és funkcionális aktivitásuk a limfociták jelenlététől függ. Ennek megfelelően a perifériás nyirokszövetek mobilis hematopoetikus és szesszilis stromális partnerei kölcsönös fejlődéstani függésben állnak egymással, ami elengedhetetlen a hatékony adaptív immunválasz kialakításához. Emellett alapvető fontosságú, hogy amíg a humán limfociták és fehérvérsejtek számos funkciója a könnyen hozzáférhető perifériás vérből vett mintákon diagnosztikus szempontból értékelhető és *in vitro* tanulmányozható is, a perifériás nyirokszövetek szesszilis összetevői gyakorlatilag nem elérhetők, így róluk az utóbbi időkig a fehérvérsejtes „parenchyma" összetevőkhöz képest csak elenyésző ismereteink voltak.

A fenti elképzelések és biológiai ismeretek által inspirálva kutatásaimat immár több mint egy évtizede ezen immunológiai-fejlődésbiológiai határterületi témában végeztem. Ennek során egér *in vivo* kísérleti modellek felhasználásával új ismereteket kívántam szerezni azokról a folyamatokról, amik hozzájárulnak a nyirokszöveteken belüli és közöttük zajló fejlődéstani kommunikációhoz. Az értekezésemben ezen munkám eredményeit foglalom össze.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BcR:	B-sejt receptor
CFSE:	karboxifluoreszcein-diacetát-hidroszukcinimid észter
CLP:	közös limfoid progenitor
ColP:	vastagbél-plakk
CP:	kriptoplakk
CRC:	CXCL12-termelő stromális sejt
DLBCL:	diffúz nagy B-sejtes limfóma
DMSO:	dimetil-szulfoxid
DSS:	dextrán-nátrium-szulfát
ECM:	extracelluláris mátrix
FALC:	zsírszöveti limfoid csoportosulás
FDC:	follikuláris dendritikus sejt
FGF:	fibroblaszt növekedési faktor
FITC:	fluoreszcein-izotiocianát
FLAg:	leveles limfoid csoportosulás
FRC:	retikuláris fibroblasztok
GFP:	zöld fluoreszcens fehérje
GWAS:	teljes genom asszociációs tanulmány
HEV:	magas endoteliális posztkapilláris venula
HRP:	tormagyökér-peroxidáz
HVEM:	herpes virus entry mediator
ICAM-1:	intercelluláris adhéziós molekula-1
IFN:	interferon
IL:	interleukin
ILC:	veleszületett limfoid sejt
ILF:	izolált nyiroktüsző
ITIM:	Immunoreceptor tirozin-alapú inhibitoros motívum
LEC:	limfoid endoteliális sejt

LIGHT: lymphotoxin exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes

LFA-1: leukocita funkcionális antigén-1

LTα: limfotoxin alfa

LTi: limfoid szövetindukáló sejt

LTo: limfoid szövetorganizáló sejt

MACS: mágneses sejtszeparálás

MAdCAM-1: mukózális addresszin sejt adhéziós molekula-1

MARCO: makrofág receptor kollagén-szerkezettel

M-CSF: makrofág kolónia-stimuláló faktor

MRC: marginális retikuláris sejt

MS: milky spot („tejfolt")

MZ: marginális zóna

NF-κB: nukleáris faktor kappa-B

NK: természetes ölősejt

PALS: periarterioláris limfoid hüvely

PCR: polimeráz láncreakció

PDGF: trombocita eredetű növekedési faktor

PNAd: perifériás nyirokcsomó addresszin

PP: Peyer-plakk

PTPN2: protein tirozin-foszfatáz 2

RAG: rekombinációt aktiváló gén

RORγ: retinsav-receptor rokon árvareceptor-gamma

SCID: súlyos kombinált immunhiány

Shh: Sonic hedgehog

SHIP: Src homológ 2-domén-tartalmú inozitol-foszfatáz

SIGN-R1: specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (CD209b)

SILT: szoliter bél-asszociált nyirokszövet

SLAM: „signaling lymphocyte activation molecule" receptorcsalád

SMP: szplanchnikus mezodermális lemez

Sn: szialoadhezin (CD169)

TLR: Toll-típusú receptor

TNF: tumor nekrózis faktor

TRANCE: TNF-rokon aktiváció-indukált citokin

TSLP: timikus stromális limfopoetin

RANK: NF-κB receptor aktivátor

VCAM-1: vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1 (CD106)

VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

VSC: verzatilis stromális sejt

vWF: von Willebrand-faktor

dc_1678_19

2. BEVEZETÉS: A PERIFÉRIÁS NYIROKSZÖVETEK KIALAKULÁSÁNAK FEJLŐDÉSBIOLÓGIAI ÁTTEKINTÉSE

2.1. A NYIROKSZÖVETI TERRITÓRIUMOK EMBRIONÁLIS INDUKCIÓJÁNAK CELLULÁRIS PARTNEREI: INDUCER ÉS ORGANIZÁTOR SEJTEK

A 90-es években újszülött egerek perifériás nyirokcsomóinak vizsgálata során egy véletlenszerű megfigyelés egy szokatlan $CD45^+/CD3^-/CD4^+$ fenotípusú, addig nem azonosított limfoid sejt-alcsoport jelenlétét igazolta. A születést követő néhány nap során ezen sejtek gyakorisága gyorsan csökken, elsősorban a timusz-eredetű T-sejtek nagymértékű bevándorlása miatt (Kelly és Scollay, 1992). Ezek a limfoid sejtek IL7Rα citokin-receptort hordoznak, és nincs T-sejtképző potenciáljuk, valamint immunglobulint sem termelnek, ugyanakkor *in vitro* tenyészetben az NK-sejtekre jellemző NK1.1 marker kifejeződését lehet rajtuk kiváltani (Mebius és mtsai, 1997).

A fejlődő nyirokcsomóba való eljutásukhoz ezek a $CD45^+/CD3^-/CD4^+$ sejtek az α4β7 integrin révén a mezenteriális (illetve a posztnatális korban átmenetileg a perifériás) nyirokcsomók magas endoteliális venulák (HEV) endotél sejtjeinek felszínén kifejeződő MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) addresszinhez kapcsolódnak (Mebius és mtsai, 1996). Embrionális korban ezen sejtek előalakjai a közös limfoid progenitorok (CLP), és feltehetőleg a fötális lépbe való eljutásuk során alakul ki a $CD3^-/CD4^+$ fenotípusuk (Mebius és mtsai, 2001).

Az egér Peyer-plakkok (PP) vizsgálata hasonló fenotípusú limfoid sejtek jelenlétét igazolva kimutatta, hogy ezen sejtek stromális mikrokörnyezete nagy számban tartalmaz VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1/CD106) glikoproteint hordozó mezenhimális sejteket. Ezek a kutatások alapozták meg a PP képződését leíró modell kialakítását, amelyben a három lépésben lezajló folyamatban a PP-előalakban a stromális és hematopoetikus összetevők egyidejű átrendeződésével jönnek létre az érett PP-ok. Ebben a folyamatban egy hematopoetikus sejt-csoport és éretlen stromális sejtek közötti kölcsönhatások a későbbi érési folyamatok során megjelenő differenciált limfoid sejtek számára alakítanak ki megfelelő mikrokörnyezetet, amik a stróma specializációját segítik elő (Adachi és mtsai, 1997). Ezek a jelentős megfigyelések szintén igazolták a nyirokcsomók és a PP képződésének kiváltására képes $CD45^+/CD3^-/CD4^+$ sejtek bizonyos fenotípusbéli különbségeit, így a nyirokcsomóra a $c\text{-}Kit^-/CD25^+$, míg a PP-ra a $c\text{-}Kit^+/CD25^-$ fenotípus jellemző (Nishikawa és mtsai, 2003). A $CD3^-/CD4^+$ sejtek újszülöttkori átvitele drámai mértékben megnövelte a PP számát (Finke és mtsai, 2002), és így ezen hatásuk miatt ezeket a sejteket limfoid szövet indukáló sejtként (LTi) jelöli a szakirodalom (Yoshida és mtsai, 1999; Eberl és Littman, 2003). PP-ban ilyen fejlődéstani/indukciós szerepet más, hasonló fenotípusú sejtek is betölthetnek, aminek megfelelően a nevezéktanban a limfoid szövet iniciátor (LTini) is előfordul (Ruddle és Akirav, 2009). Ezidáig az LTi (és esetleg LTini) lehetséges viszonyait a PP-kon kívül más perifériás nyirokszövetekben nem vizsgálták részle-

tekbe menően. Ezen kutatások eredményeként a korábban már megismert NK sejtek után az LTi sejtek azonosítása jelentette annak az addig ismeretlen sejt-csoport létezésének az első bizonyítékát, melyeket jelenleg összefoglalóan veleszületett limfoid sejteknek (ILC) nevezünk. Ezek közül a mostani besorolás alapján az LTi/LTini sejtek a 3. típusú ILC (ILC3) közé tartoznak. Az utóbbi időben az ILC sejtek (elsősorban a 2. típusú és 3. típusú nem-LTi alcsoport) a mintázat-szelektív veleszületett, és az antigén-specifikus adaptív immunológiai mechanizmusok közötti összekapcsolódásban betöltött alapvető szerepük miatt egyre intenzívebb kutatás tárgyát képezik, fiziológiás és kórtani jelentőségük szempontjából egyaránt (Spits és Cupedo, 2012; Artis és Spits, 2015; Vivier és mtsai, 2018).

Amint a később nyirokszövetekké váló embrionális területek kialakultak, a kompartmentalizált nyirokszöveti struktúra létrejöttét az érett limfociták tömeges megtelepedése által nyújtott további morfogén hatások segítik elő. Ezek alapállományának feltehetőleg első érési eseménye a differenciálatlan mezenhímális sejtek VCAM-1–pozitív sejtekből álló csoportosulásokká szerveződése és LTi sejtekkel való kapcsolódása. Ebben a stádiumban ezen alapállományi sejteket nyirokszövet organizátor (LTo) sejteknek nevezzük.

A következő fejlődési szakaszban az érett T- és B-sejtek érkezése „hígítja" és egyidejűleg a nyirokszöveten belül áthelyezi az LTi sejteket. Így az az időablak, amíg a megfelelő helyeiken a fiziológiás organogenezis részeként (LTi – LTo összekapcsolódás eredményeként) nyirokszövet-iniciálás történhet, valószínűleg lezárul. Ennek következtében a mezenhímális sejteket a korábbihoz képest eltérő limfocita-mikrokörnyezet veszi körül, amire ezek a stromális prekurzorok további érési-specializálódási folyamatokkal válaszolnak. Így a follikuláris dendritikus sejtek (FDC) kialakulásához a nyirokszövetnek dedikált területen belül B-sejtekre van szüksége (Kapasi és mtsai, 1993), míg a T-sejtek a T-zóna retikuláris fibroblasztok (FRC) által kialakított mikrokörnyezetben dúsulnak.

2.1.1. Az LTi sejtek korai stromális partnerei: LTo populáció(k)

Az LTi sejtek partnereit reprezentáló VCAM-1-pozitív LTo sejtek jellemzőit vizsgáló kutatások igazolták az ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) és MAdCAM-1 adhéziós molekulák kifejeződését ezen mezenhímális sejteken (Adachi és mtsai, 1997). A nyirokcsomó és PP előtelep mintákból tisztított LTo sejtek vizsgálata kimutatta ezen markerek eltérő expressziós szintjét (Cupedo és mtsai, 2004; Okuda és mtsai, 2007), amik szükségesek a két sejtcsoport összekapcsolódásához, ugyanakkor kifejeződésüket az LTo sejtek LTi sejtekkel való kölcsönhatása nagymértékben befolyásolhatja.

2.1.2. Az LTi és LTo sejtek fejlődéstani jellemzői

Az Ikaros fehérje (cinkujj-típusú DNS-kötő transzkripciós faktor) az összes limfoid sejt korai specializálódásához elengedhetetlen, aminek N-terminális régiója által közvetített nagy affinitású szekvencia-specifikus kötődése embrionális és felnőtt korban is alapvető a T/B/NK-sejtek elköteleződéséhez (Georgopoulos és mtsai, 1994). Ezzel ellentétben a C-terminális

domén deléciója a T/B/NK-sejt hiány mellett a perifériás nyirokcsomók és a PP hiányához vezetett (Wang és mtsai, 1996). Az embrionális LTi sejtek fejlődéséhez emellett szükséges az Id2 transzkripciós faktor is (Yokota és mtsai, 1999). Az Ikaros hiányához hasonlóan Id2 deficiencia következtében sem fejlődnek nyirokcsomók és PP, amihez az LTi sejtek hiánya társul, valamint az NK és Langerhans-sejtek differenciálódása is gátlódik (Hacker és mtsai, 2003).

Az LTi sejtekre szelektíven ható transzkripciós faktorok egyike a ROR családba tartozó RORγt (thymus-isoform of RORγ, a CD4/CD8 kettősen pozitív timocitákban is megjelenő) izoforma, ami az embrionális LTi sejtek hematopoetikus őssejtekből történő fejlődését irányítja (Sun és mtsai, 2000; Eberl és mtsai, 2004).

A RORγt transzkripciós faktornak a hematopoetikus őssejtek LTi irányú elköteleződéssel való kapcsolódása kettős jelentőséggel bír. Az egyik ennek a transzkripciós faktornak a kifejeződése az LTi sejtvonal érésének igen szelektív elősegítésére. A második ezen fehérje jelenlétének kimutatásán (anti-RORγt antitestek vagy riporter gén, pl. RORγt promóter által irányított GFP felhasználásával transzgenikus egerekben) keresztül az LTi sejtek *in situ* meghatározása és „fate mapping" vizsgálata (Eberl és Littman, 2004). Szövettani vizsgálatok kimutatták, hogy az embrionális májban történő képződésüket követően a RORγt-pozitív sejtek a nyirokcsomók, PP és lép nyirokszöveti előtelepeiben perivaszkulárisan a VCAM-1 pozitív sejtekkel közeli csoportosulásokban helyezkednek el. Az Id2 hiányához hasonlóan a RORγt inaktiválása meggátolta a nyirokcsomók és a PP fejlődését, ugyanakkor a lép fejlődése az Id2 és RORγt hiányában nem károsodott. Az LTi sejtek érésében (és valószínűleg a túlélésükben is) betöltött szerepe mellett a RORγt kifejeződése a bőr és nyirokcsomók invariábilis NKT sejtjeinek képződéséhez is elengedhetetlen (Michel és mtsai, 2008; Doisne és mtsai, 2009). Érdekes módon annak ellenére, hogy madarakban szintén kimutatható az Id2 és Ikaros, valamint rendelkeznek NK-szerű aktivitást és fenotípust hordozó limfoid sejtekkel, nem fejlődik bennük nyirokcsomó (Lampisuo és mtsai, 1999; Krishan és mtsai, 2005).

Az LTi sejtek transzkripcionális szabályozására vonatkozó ismeretek gyors bővülésével ellentétben az LTo sejt-prekurzorok eredete és fejlődéstani útvonalai jórészben feltáratlanok. Ez részben a hematopoetikus sejtek fenotipizálására alkalmas markerek és a mezenhímális sejtek megkülönböztetésére alkalmas markerek nagy számbeli eltérésére is visszavezethető, utóbbira jószerivel csak elenyésző számú validált marker áll rendelkezésre, és ezek legtöbbje több mezenhímális sejttípust is jelöl. Bár a korai posztnatális korban elvégzett sejt-transzfer kísérletekkel igazolható volt a struktúrált nyirokszövetek ektópiás indukálhatósága (Cupedo és mtsai, 2004), jelenleg nem ismert, hogy milyen fejlődéstani program irányítja az elkötelezetlen mezenhímális előalakok kijelölt elhelyezkedésű specializált stromális elemekké történő transzformálódását. Különböző nyirokszöveti előalakok mezenhímális elemeinek összehasonlító vizsgálata kimutatta a tumor nekrózis faktor (TNF) szupercsalád egyes tagjainak, illetve egyéb citokineknek és homeosztatikus kemokineknek az eltérő kifejeződését (Tumanov és mtsai, 2003). Az LTi sejtek általános hasonlóságait és az egyes perifériás nyirokszövetek közötti fejlődéstani események és jellemzők különbségeit figyelembe véve feltételezhetjük, hogy a peri-

fériás nyirokszövetek (lép, PP, nyirokcsomók) eltérő fejlődésbiológiai morfogén-mintázatának hátterében az LTo sejtek/előalakok eltérései állhatnak.

A felnőtt perifériás nyirokszövetek perifériás részében elhelyezkedő retikuláris fibroblaszt alcsoport (marginális retikuláris sejtek - MRC) azonosítása felvetette a felnőtt LTo analóg mezenhímális sejtpopuláció létezésének lehetőségét (Katakai és mtsai, 2008). Ezen sejtek számos LTo jellemzőt mutatnak, így a VCAM-1, ICAM-1 és MAdCAM-1 adhéziós fehérjék kifejeződését, valamint a CXCL13 kemokin-termelésnek a limfotoxin β-receptor (LTβR, a nyirokszöveti organogenezisben alapvető fontosságú TNF szupercsalád-tag) ligandkötésén keresztüli indukálását (Fütterer és mtsai, 1998). Az MRC populációnak a nyirokszövetek perifériás részére (nyirokcsomók szubkapszuláris szinusza vagy a lép fehér pulpa marginális szinusz közeli régiója) korlátozódó jelenléte arra utal, hogy a nyirokszöveti szerkezet kialakulásához a hematopoetikus sejtek folyamatos vándorlása mellett a stromális előalakok korlátozott mértékű áthelyeződése társul. Az utóbbi időkben egyre szélesebb körben elterjedt Confetti/Brainbow marker és Cre-Lox kombinálásával végzett sors-nyomonkövetési eljárással igazolni lehetett, hogy a nyirokcsomók embrionális előtelepeiben a FAP (fibroblast activation protein – II. típusú membrán szerin proteáz) kifejeződése alapján a nyirokcsomó FRC, MRC és FDC komponensek közös FAP-pozitív sejtekből differenciálódnak, ugyanakkor a lép esetében a stróma fejlődése más útvonal mentén történik (Denton és mtsai, 2019).

Az utóbbi időben a hematopoetikus LTi és a mezenhímális LTo sejtek mellett a nyirokcsomó-előtelep harmadik fontos szervező-iniciáló összetevőjeként felvetődött a nyirokendotél (LEC) sejtek szerepe is. A LEC sejtek feltehetőleg az LTi sejtek RANK-szignalizációs kölcsönhatásaiban fontos résztvevők lehetnek a helyi mezenhíma nyirokszövet irányú specifikálásában (Onder és mtsai, 2017; Onder és Ludewig, 2018).

2.1.3. A perifériás nyirokszövetek fejlődésében résztvevő főbb morfogén faktorok

A limfoid organogenezis megértésében az egyik legfontosabb mérföldkő azon fehérjecsoport biológiai szerepének újraértelmezése volt, amelynek a tumor nekrózis faktor (TNF) és limfotoxin (LT) voltak az elsőként azonosított tagjai. Ezek később számos egyéb taggal és egyéb molekulákkal (kemokinek és más citokinek) bővültek, illetve ligand-receptor viszonyaik megértésével ezen nyirokszöveti morfogének funkcionális sokrétegűségére is fény derült. Az egyes molekuláris résztvevők azonosításán túlmenően az idevonatkozó kutatások fontosságát jelzi, hogy azok a krónikus gyulladás és autoimmun megbetegedések során alkalmazható immunszuppresszáns kezelés koncepcionális megújulását, és a korábbiaknál jóval hatékonyabb terápiás készítmények kifejlesztését eredményezték.

2.1.4. TNF/LT ligandok és receptoraik – részleges átfedés és komplementaritás

A 19 ligandot és 29 receptort felölelő TNF/LT família (Bodmer és mtsai, 2002; Hehlgans és Pfeffer, 2005) első két tagját (eredetileg cachectin/TNFα illetve LT/TNFβ elnevezéssel) gyulladások és bizonyos daganatok vérzéses szövet-nekrózisának kiváltásában játszott szerepük alapján azonosították és klónozták (Pennica és mtsai, 1984; Gray és mtsai, 1984; Müller és mtsai, 1987). Későbbi tanulmányok igazolták, hogy a TNF és LT is előfordul aktivált limfociták felszínén (Ware és mtsai, 1992). A TNF ligandot két receptor ismeri fel, a TNF-R1/p55 (CD120a) és a TNF-R2/p75 (CD120b) (Brockhaus és mtsai, 1990) amelyek a szolúbilis LT ligandot is kötik (Hohmann és mtsai, 1990). Az akkor TNFβ néven is megjelölt LT további szerkezeti vizsgálata kimutatta egy új összetevő jelenlétét a sejtfelszíni heterotrimer ligandban (Browning és mtsai, 1993), ami egy újabb átnevezést tett szükségessé. Így a korábbi TNFα helyett a TNF, míg a szolúbilis LT/TNFβ ligand a LTα, a sejtfelszíni formához társuló összetevő a LTβ megjelölést kapta. Génexpressziós vizsgálatok igazolták, hogy a LTβ mRNS konstitutív módon kifejeződik a lép fehér pulpában (Pokholok és mtsai, 1995). Heterotrimer formában a domináns sejtfelszíni forma LTα/LTβ2 összetételű (Browning és mtsai, 1995), ahol egy (szolúbilis) LTα nem-kovalens módon kapcsolódik két (transzmembrán) LTβ alegységgel. Ezt a heterotrimer formát a saját receptora, a LTβR ismeri fel (Crowe és mtsai, 1994), bár egy kisebb frakció LTα2/LTβ formában a TNF-R1 receptorhoz is kötődhet (Ware és mtsai, 1995). A domináns LTα/β2 trimer formában az LTα összetevő szükséges a komplex-képzéshez, míg a specifikus LTβR felismerését a két LTβ komponens biztosítja (Williams-Abbott és mtsai, 1997).

A TNF/LT molekulák nyirokszöveti organogenezisben játszott fontos szerepét elsőként a LTα hiányos egér nyirokszöveteinek drámai eltérései mutatták, ahol a nyirokcsomók és a PP hiányához a lép súlyos szerkezeti zavarai társultak (de Togni és mtsai, 1994). Korábbi biokémiai és *in vitro* tanulmányok kimutatták az egyes LT/TNF família-tagok receptor-kötéseinek átfedéseit (Bodmer és mtsai, 2002; Hehlgans és Pfeffer, 2005), így az egyes ligandokra és receptorokra deficiens egerek *in vivo* vizsgálata ennek megfelelően összetett (és esetenként ellentmondásos) eredményekhez és interpretációhoz vezetett. Például az egyik LTα-deficiens egér rendelkezett hasi nyirokcsomóval (Banks és mtsai, 1995), míg egy korábbi hasonló modellben ezeknek a nyirokszöveteknek a hiányát írták le (de Togni és mtsai, 1994).

Miután a LTα szolúbilis homotrimerként, illetve a LTβ összetevőhöz kapcsolódva sejtfelszíni heterotrimerként is előfordul, szükséges volt annak meghatározása, hogy a LTα milyen összetételben/formában fejti ki morfogén hatását a nyirokszöveti organogenezisben. Cre-Lox kivágással, illetve a LTβ gén deletálásával deficienssé tett egerekben (ahol LTα3 formában csak a TNF-R1 és TNF-R2 által felismerhető LTα ligand maradt) általában a LTα hiányához társuló elváltozásokat figyelték meg (Alimzhanov és mtsai, 1997; Koni és mtsai, 1997). A LTα hiányával ellentétben a LTβ inaktiválása során a nyaki és hasi nyirokcsomók létrejöttek, ami arra utal, hogy ezekben a régiókban a limfoid organogenezis a LTα/β2 komplextől független. Ugyanakkor LTβR hiányában egyik nyirokcsomó sem jelent meg, ezáltal a LTβR-hoz kötődő alternatív ligand lehetősége merült fel, ami a LTα- vagy LTβ-deficiens egérben is hatást fejthet

ki (Fütterer és mtsai, 1998). A LIGHT (**l**ymphotoxins, exhibits **i**nducible expression, and competes with HSV **g**lycoprotein D for **H**VEM, a receptor expressed by **T** lymphocytes) ligandról igazolták, hogy járulékos ligandként működhet a herpes virus entry mediator (HVEM) receptor és LTβR számára (Mauri és mtsai, 1998), miután a LTβ/LIGHT kettős deficiens egérben, a LTβ KO egérben észlelt gyakorisághoz képest kevesebb nyirokcsomó fejlődött ki. Ugyanakkor a kombinált KO egérben a hasi nyirokcsomók továbbra is kialakultak, illetve a lép szerkezeti eltérések is enyhébbek voltak a LTβR-hiányos egérhez viszonyítva. Ez egy harmadik potenciális LTβR-ligand létezését vetette fel (Scheu és mtsai, 2002). Jelenleg a TNF ligand/receptor szupercsaládban a TNF, TNF-R1/2, LTα, LTβ, LTβR, LIGHT és HVEM résztvevőket a TNF család elsődleges tagjainak tekintjük (Ware, 2008).

A humán IgG-hez fúzionáltatott szolúbilis LTβR analóg (LTβR-huIgG) időzített vemhes egérbe való oltásával az oltás időpontjától függően a hasi vagy egyéb nyirokcsomók fejlődése különböző mértékben gátolható volt. Ennek alapján egy fej-farok irányú időbeli fejlődéstani grádiens rajzolódott ki, aminek megfelelően a fejvégi (nyaki, hónalji) nyirokcsomók fejlődésének gátlásához korai (12-14 embrionális nap), míg a térdhajlati nyirokcsomók gátlásához későbbi (16. embrionális nap) kezelés volt hatékony (Rennert és mtsai, 1996). Egy reverz kísérletben nyirokcsomókkal nem rendelkező LTα-hiányos vemhes egerek agonista anti-LTβR monoklonális antitesttel történő kezelése az időbeli lefolyásnak megfelelő anatómiai sorrendben nyirokcsomó-szerű aggregátumok fejlődését indukálta. Ezek szerkezete azonban nem jutott el a felnőtt típusú kompartmentalizált elrendeződéshez, feltehetőleg a LTα ligandnak a TNF-R1 és TNF-R2 receptorain keresztül érvényesülő hatásainak elmaradása miatt (ezáltal kizárva LTα TNF általi helyettesíthetőségét). Ennek megfelelően a TNF-R1 és TNF-R2 teljes gátlása a LTβR szignalizáció felfüggesztésével kombinálva az összes nyirokcsomó fejlődését megakadályozta (Rennert és mtsai, 1998). Egyelőre nem ismert, hogy a LTβR hiánya önmagában miként válthatja ki a nyirokcsomó-fejlődés olyan nagymértékű gátlását, mint amihez a TNF/LTα és LTβ eddig ismert összes receptor-kötésének antitest-közvetítette gátlására volt szükség.

A LTα vagy LTβ hiánya miatt kialakuló, változó jellegű nyirokcsomó-hiánnyal szemben a PP fejlődése minden esetben gátlódott, ugyanakkor a LIGHT hiánya nem akadályozta meg fejlődésüket (Pfeffer, 2003). A nyirokcsomókkal ellentétben viszont az agonista anti-LTβR antitesttel való kezelés nem tudta helyreállítani a megjelenésüket (Rennert és mtsai, 1998). A TNF/LTα/LTβ ligandok kombinált hiánya az összes perifériás nyirokszövet fejlődési gátlását eredményezte, amely súlyosabb volt, mint a LTβ vagy TNF/LTβ kettős deficiens mutánsokban, ami ezen citokineknek a nem-redundáns szerepére utal (Kuprash és mtsai, 2002).

Nyirokcsomókban (és kevésbé kifejezetten a PP-ban) a LTβ B-sejtekre vagy T-sejtekre korlátozódó hiánya nem befolyásolta a nyirokszöveti szerkezetet, míg a LTβ-deficiens B-sejtek esetén a lép szerkezete nagymértékben (bár a komplett LTβ-hiányhoz képest kevésbé súlyosan) károsodott. Ez a megfigyelés a nem-B-sejteken kifejeződő LTβ szerv-specifikus kiegészítő szerepére utal (Tumanov és mtsai, 2003). Bár a LTα vagy LTβR hiányában a lép különálló szervként kialakul, a marginális zóna és a T:B kompartmentalizáció, valamint az FDC köré elrendeződő nyiroktüszők hiánya súlyos szerkezeti zavarra utal (de Togni és mtsai, 1994; Alimzhanov és

mtsai, 1997; Fütterer és mtsai, 1998). Mindezek ellenére ezekben a mutánsokban a lép két fő részletét alkotó vörös és fehér pulpa állománya továbbra is elkülönül.

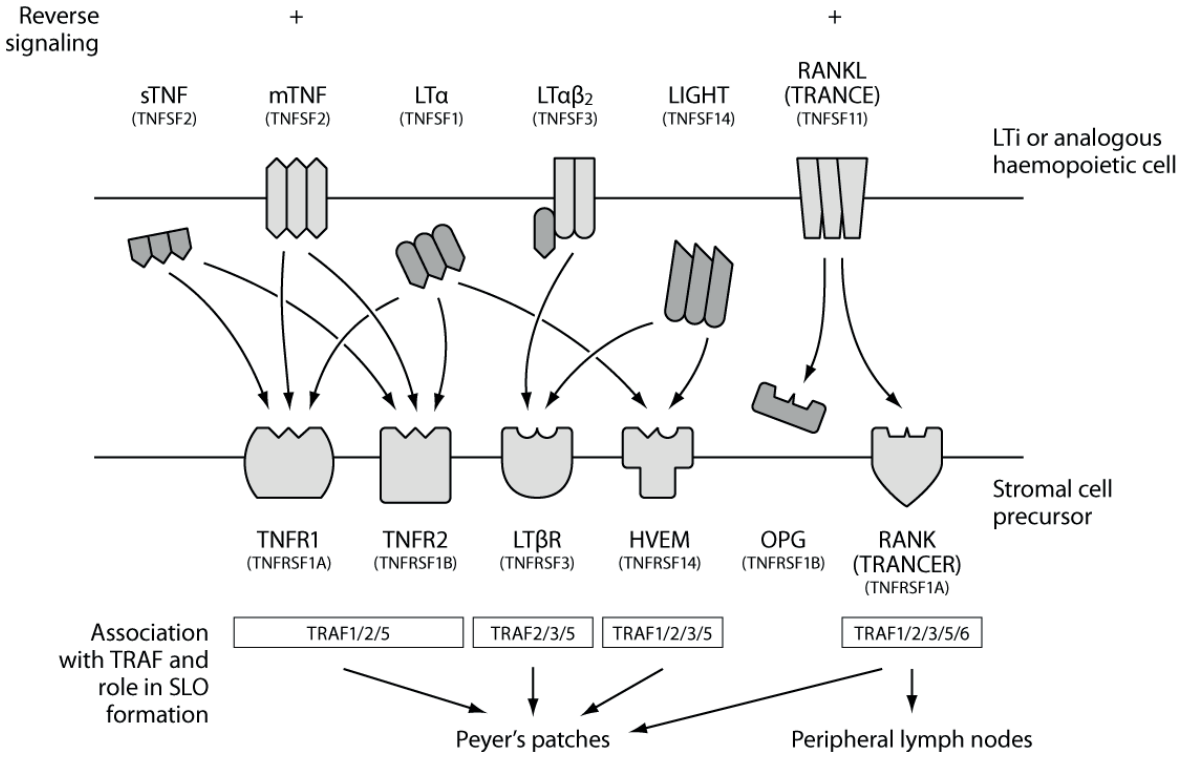
A TNF és receptorainak hiánya a LTαβ és LTβR hiányához viszonyítva sokkal mérsékeltebb hatást vált ki. TNF-R1 hiányában nyirokcsomók létrejönnek, ugyanakkor a PP fejlődés károsodott (Pasparakis és mtsai, 1997). TNF-R2 hiányában nincs értékelhető nyirokszöveti defektus, bár nem alakul ki FDC, és a csíracentrum reakció is gátolt (Pasparakis és mtsai, 1996). Ezek alapján úgy tűnik, hogy az embrionális limfoid területiumok LTα és LTβ által közvetített korai specifikálását követően a TNF és receptorai (elsősorban a TNF-R1) további részletesebb sejt-differenciációs és szövet-érési eseményeket irányítanak, ami révén a nyirokszövetek képessé válnak hatékony immunválaszok szöveti hátterének kialakítására.

A TNF közvetlen hiányának a nyirokszöveti fejlődésre kifejtett hatásai mellett az I. típusú interferonok közül az IFNβ hiánya szintén mérsékelt hatást fejt ki a lép szerkezetére. Feltételezhetően a TNFα termelődésének szabályozásán keresztül közvetetten befolyásolja a T/B elkülönülést és a vörös pulpa makrofág-kolonizációját. A közös receptorhoz való kapcsolódásuk ellenére a família további ligand tagjai (IFNα, IFNω és IFNκ) nem pótolják az IFNβ hiányát (Deonarain és mtsai, 2003).

A TNF-család további tagjai közül a TRANCE (RANKL) és receptora a TRANCE-R/RANK szintén fontos szerepet tölt be a nyirokcsomók fejlődésében, ugyanakkor nem befolyásolják a lép és PP kialakulását, annak ellenére, hogy hiányuk változó súlyosságú lép-szerkezeti eltérést okoz (Kong és mtsai, 1999; Dougall és mtsai, 1999; Kim és mtsai, 2000). Újszülött nyirokcsomóban a TRANCE a $CD45^{+}/CD3^{-}/CD4^{+}$ LTi fenotípusú sejtek felszínén jelenik meg a LTαβ2 liganddal és TRANCE-R (RANK) receptorral együtt, míg a LTβR a nem-hematopoetikus összetevőkön fejeződik ki. Fejlődő nyirokcsomókban a TRANCE-RANK kölcsönhatás során a LTi sejteken fokozódik a LTαβ2 ligand kifejeződése, ezáltal egy pozitív visszacsatolási hurok révén a stromális LTo sejteken érvényesülő intenzívebb LTβR szignalizáció egy fokozott IL-7 és TRANCE termelődésen keresztül támogatja a nyirokcsomó-kezdemény differenciálódását (Vondenhoff és mtsai, 2009). RANK-szignalizációban gátolt egér-embriók IL-7 kezelését követően helyreállt a stromális prekurzorok nyirokszöveti előtelepekben megfigyelt csoportosulása és a nyirokcsomó korai fejlődése, ugyanakkor ezen képletek szerkezeti érése elmaradt (Yoshida és mtsai, 2002).

Az elsődleges LT/TNF receptorok többsége (TNF-R2, LTβR és HVEM), valamint a TRANCE-R/RANK a TRAF (TNF-associated factors - TRAF-1,2,3,5 és TRAF-6) megfelelő szekvenciáihoz kapcsolódó konzervált szerkezetű gátló ITIM szakaszt tartalmaz, míg a TNF-R1 citoplazmáris szakaszában halál-domén (DD) található (Ha és mtsai, 2009). A TRAF-4 fehérjének a limfoid organogenezis során a TNF család szignalizációjában játszott szerepe jelenleg ismeretlen (Cherfils-Vicini és mtsai, 2008).

A TNF-R1 közvetetten a TRAF-1,2 és TRAF-5 fehérjékkel léphet kölcsönhatásba, míg a TRAF-6 az IL-1R-asszociált kináz (IRAK) részvételével az IL-1 receptorhoz kapcsolódhat, ezáltal további receptorokról (IL-18R és TLR) is közvetíthet jeleket (Cao és mtsai, 1996). A TRAF variánsok különböző LT/TNF receptorokhoz való kapcsolódásának szerteágazó jellege miatt a pontos



2.1. ábra: A mag-LT/TNF család tagjainak receptor-ligand viszonya, TRAF-kapcsolódása és esetleges reverz szignalizáció fennállása

(*Balogh P: Lymphotoxin/Tumor Necrosis Factor Family Members as Morphogenic Factors. In: Developmental Biology of Peripheral Lymphoid Organs, (Ed. Balogh, P) 2011, p. 15-24. Springer-Verlag Berlin Heidelberg)*

jelpálya útvonalak és szignalizációs válaszok jellemzőit a számos adat ellenére egyelőre nem ismerjük pontosan. A TNF/LT rendszer ligand-receptor kapcsolódásait a **2.1. ábra** illusztrálja.

A centrális/primer és perifériás/szekunder nyirokszövetek immunológiai szerepeit a hagyományos immunológiai tankönyvek élesen megkülönböztetve mutatják be, ugyanakkor a fenti mediátorok némelyikének biológiai szerepe felülírja ezt a megkülönböztetést. Így a RANK és LTβR működése elengedhetetlen a tímusz medulláris hám összetevőinek differenciálódásához, bővítve az ezeket a faktorokat célzó terápiás beavatkozások potenciális cél-szerveit. Így a LT/TNF hatást célzó kezelések a szekunder nyirokszöveti szerveződés mellett, az itt zajló egyéb immunológiai folyamatokat (pl. centrális tolerancia és T-sejt készlet szelekció) is befolyásolhatják (White és mtsai, 2010; Akiyama és mtsai, 2013).

2.1.5. A perifériás nyirokszervek fejlődésének citokin/kemokin szabályozása

Az elkötelezett hematopoetikus sejtvonalak a belső programozás és a mikrokörnyezeti hatások integrált eredményeként alakulnak ki, utóbbiak között a már tárgyalt TNF család tagjainak és egyéb szolúbilis faktoroknak a részvételével. Ezen nem-TNF típusú faktorok közül az egyik legkorábban azonosított citokin az interleukin-7 (IL-7). Bár több évtizeddel korábban az IL-7-et eredetileg az egér pre-B-sejtek és fejlődő timociták differenciálódásának egyik fontos mediátoraként azonosították (Namen és mtsai, 1988; Murray és mtsai, 1989; Noguchi és mtsai,

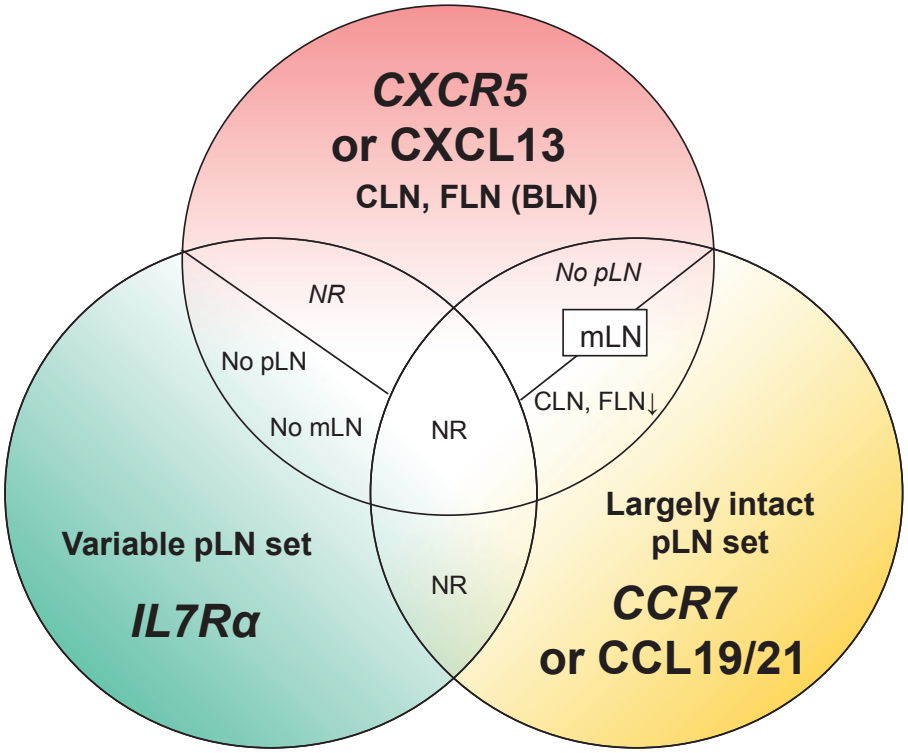
1993), ezt követően a limfoid organogenezisben, valamint a nyirokszöveti struktúra fenntartásában játszott szerepére is fény derült.

Az IL-7 az IL7Rα lánchoz (CD127) nem-kovalensen kapcsolódó gamma-láncból (γc) álló IL-7 receptor komplexhez (IL-7R) kapcsolódik. Ezek közül az IL-7Rα a TSLP (thymic stromal lymphopoietin) tímusz, tüdő és bélhám sejtek által termelt IL-7-szerű szolúbilis citokint felismerő receptor (TSLPR) összetevőjeként is működik (Sims és mtsai, 2000). A γc más receptorokban is fontos szerepet tölt be, így IL-2, IL-9, IL-15 és IL-21 receptorainak esetében, melyek számos túlélési, ko-stimulációs és proliferációs hatást fejtenek ki, elsősorban a megfelelő receptorokat hordozó T-sejt alcsoportokban (Rochman és mtsai, 2009; Overwijk és Schluns, 2009). A TSLP és IL-7 kiegészítő funkciókat láthatnak el, amennyiben az embrionális B-sejtek túlnyomórészt függetlenek IL-7-től, ugyanakkor érzékenyek TSLP-re. Emellett a TSLP befolyásolja a B-1 alcsoport perzisztenciáját (Astrakhan és mtsai, 2007), míg a csontvelői B-sejt érés IL-7 függő (Vosshenrich és mtsai, 2003; Dias és mtsai, 2005). Újabb adatok szerint rheumatoid artritiszes betegek szinoviális fibroblasztjai szintén termelnek TSLP-t, ami elősegítheti a krónikus gyulladáshoz társuló limfoid neogenezist (Ozawa és mtsai, 2007), míg a TSLP szignalizáció hiánya *tslpr*$^{-/-}$ egerekben fokozott bélgyulladáshoz vezetett (Taylor és mtsai, 2009).

A PP organogenezisének vizsgálata során egy furcsa ellentmondás mutatkozott: az IL-7Rα deficiens egerekben a számos érett limfocita jelenléte ellenére a PP nem fejlődött ki, míg RAG-2-deficiens egerekben az érett limfociták hiánya ellenére a PP VCAM-1 pozitív előtelepe megjelent (Adachi és mtsai, 1998). Anti-IL7Rα monoklonális antitest vemhes egerekbe való oltásával az embriók PP-előtelepének megjelenését teljes mértékben gátolni lehetett (Yoshida és mtsai, 1999). Az IL-7R γ-lánc összetevőhöz kapcsolt Jak3 fontos szerepet tölt be az IL-7R-irányította limfoid organogenezisben, mivel hiánya az IL-7Rα hiányához hasonlóan gátolta a PP és nyirokcsomók fejlődését (Cao és mtsai, 1995; Park és mtsai, 1995; Luther és mtsai, 2003). Érdekes módon ezeknek a defektusoknak egyike sem befolyásolta a lép fejlődését.

Mi az IL-7 saját jelentősége ezekben a folyamatokban? Érdekes módon IL-7-hiányos egerekben a nyirokcsomó-fejlődés változó mértékben gátlódott. A hasi nyirokcsomók általában kialakultak, míg a nyaki, térdhajlati és zsigeri (vese, máj, hasnyálmirigy melletti, valamint a paraaortikus) nyirokcsomók gyakorisága drasztikusan csökkent vagy hiányzott (Meier és mtsai, 2007) a PP hiányával együtt (von Freeden-Jeffry és mtsai, 1995). Jelenleg nincs adat a TSLP hiányának a nyirokcsomók és a PP fejlődésére kifejtett hatásáról, a hasi nyirokcsomó meglétén kívül (Taylor és mtsai, 2009). Az IL-7 fokozott termelése az LTi sejtek számbeli növekedésén keresztül ektópiás nyirokcsomók megjelenéséhez vezetett, és az IL-7 hozzáadása fokozta az LTi sejtek stróma-sejtekkel együtt kialakított *in vitro* kultúrában való túlélését és sejtfelszíni LTαβ2 heterotrimer kifejeződését (Meier és mtsai, 2007).

A T- és B-sejtek szegregációját a perifériás nyirokszövetekben a G-fehérjéhez kötött CXCR5 kemokin receptor irányítja (eredetileg Burkitt's lymphoma receptor-1/BLR1), amely hatására a B-sejtek és a follikuláris T-sejtek a nyiroktüszőbe vándorolnak (Förster és mtsai, 1996) a később azonosított CXCL13 (eredetileg B-lymphocyte chemoattractant – Blc) megkötésén keresztül (Gunn és mtsai, 1998). CXCR5-hiányos egerekben a lép limfociták diffúz elrendeződése mel-



2.2. ábra: Az interleukin-7 (IL7), homeosztatikus kemokinek és receptoraik szerepe a nyirokcsomók fejlődésében

A diagram az egyes körökben jelölt különböző citokinek (vastagan szedett) vagy receptoruk (dőlt) hiányának a főbb perifériás nyirokcsomók (pLN) megjelenésére gyakorolt hatását mutatja. Az átfedő területek a releváns faktorok együttes hiányának kombinált fenotípusát mutatják. A CXCR5/CXCL13-IL7Rα és a CXCR5/CXCL13-CCR7/CCL19/21 interszekciójának felső részlete a receptor-receptor kettős mutáns fenotípust, az alsó részlet a ligand-ligand 2x KO fenotípust mutatja, utóbbiban a hasi nyirokcsomók (mLN) mindkét esetben kialakulnak. CLN, nyaki nyirokcsomók; FLN, áll és arc-nyirokcsomók; BLN, hónalji nyirokcsomók; NR, nincs adat. *(Balogh P: Homeostatic chemokines, cytokines and their receptors in peripheral lymphoid organ development. In: Developmental Biology of Peripheral Lymphoid Organs, (Ed. Balogh, P) 2011, p. 39-45. Springer-Verlag Berlin Heidelberg)*

lett a lágyéki nyirokcsomók is hiányoztak, és a PP fejlődése is változó mértékben károsodott. A lépben a CXCL13 ligand CXCR5 receptorhoz kötődését követően a B-sejtek LTαβ2 kifejeződése fokozódik.

A születés utáni időszakban a nyirokcsomóban a B-sejtek megtelepedése és pozicionálódása a CXCL13-tól független (Cupedo és mtsai, 2004). A nyirokcsomók érett szerkezete a B-sejtek megfelelő mennyiségű LTαβ2-expresszióját követően alakul ki, amelyek az FDC indukcióján keresztül fokozott mennyiségű CXCL13 ligandot termelnek, ezáltal fokozva a B-sejt bevándorlást. PP-ban a CXCL13 ligand szintén fokozza a VCAM-1 ligand-α4β7 integrin kapcsolódást (Finke és mtsai, 2002). Ezek alapján szövet-specifikus módon eltérő mechanizmusok és különböző sejtpartnerek (LTi vagy érett limfociták, stromális/LTo sejtek vagy FDC) együttműködésével alakul ki a megfelelő intenzitású LTαβ2-irányított szignalizáció, amiben az IL-7Rα és CXCR5 amplifikáló szerepet tölt be.

A fentiek mellett a CCR7 kemokin receptor és ligandjai, a CCL21 és CCL19, szintén szerepet játszanak a limfoid organogenezisben. Felnőtt egerekben a CCR7 ligandkötése a T-sejtek és

dendritikus sejtek magas endoteliális venulákon (HEV) és afferens nyirokereken keresztüli eljutását irányítja a nyirokcsomóba (Förster és mtsai, 2008). Az embrionális LTi sejtek hordozzák a CXCR5 és CCR7 receptorokat, és a megfelelő (CXCL13 és CCL19/21) ligandok grádiensében *in vitro* rendszerekben hatékonyan vándoroltak (Honda és mtsai, 2001). CXCL13 és CCR7 illetve a CXCR5 és CCR7 kombinált hiányában a nyirokcsomó-fejlődés fokozottan gátlódott, de hasi nyirokcsomók továbbra is kialakultak (Ohl és mtsai, 2003). A fentiekkel szemben a CXCL13 hiány és IL-7Rα inaktiválás kombinálása az LTi sejtek hiányán keresztül teljes mértékben megakadályozta a hasi nyirokcsomók kialakulását, ami a CXCR5 és IL-7R szignalizációnak az LTi sejtek túlélésére kifejtett meghatározó szerepét igazolja (Luther és mtsai, 2003). Emellett számos jelentős eltérés van a CXCL13 és CCL19/21 kombinált hiánya (ami mellett képződhetnek nyirokcsomók) és a CXCR5/CCR7 receptor együttes hiánya között, amikor minimális a nyirokcsomó-képződés (Müller és mtsai, 2003). Összefoglalóan ezek a megfigyelések azt támasztják alá, hogy a különböző elhelyezkedésű nyirokcsomók fejlődése jelentősen eltérő CXCL13/CXCR5, IL-7Rα és CCL21/CCR7 függés-mintázatot mutat (**2.2. ábra**).

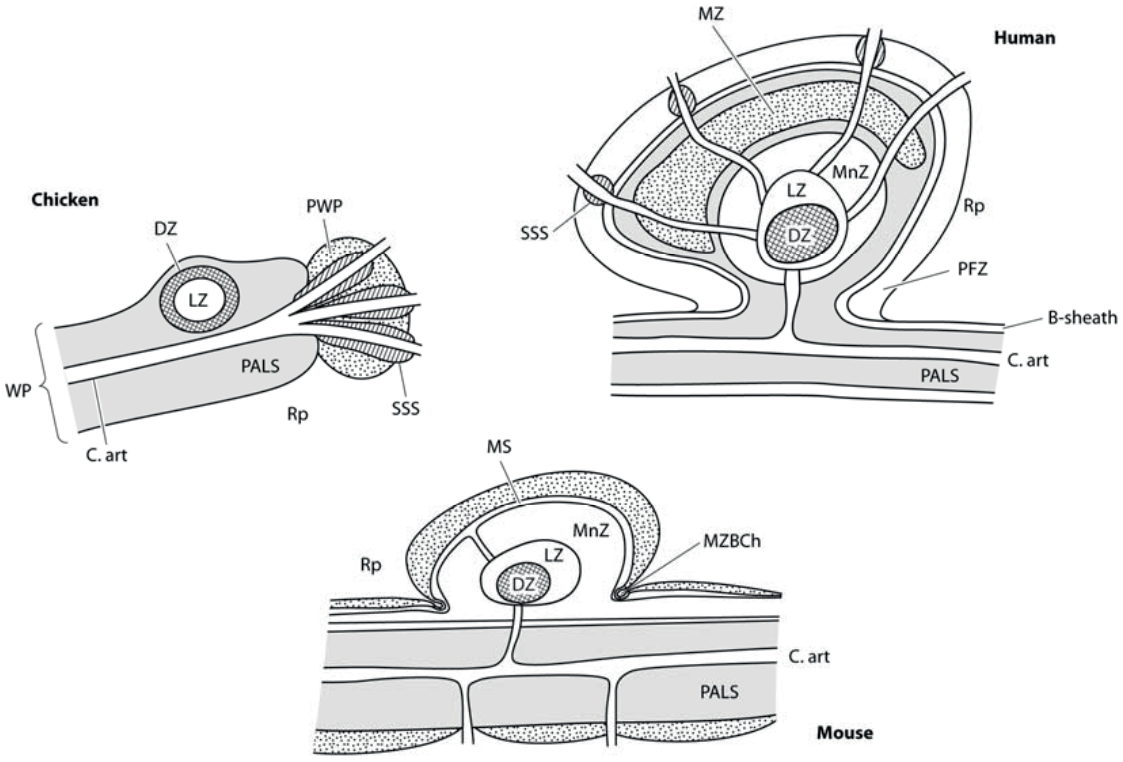
dc_1678_19

3. A LÉP FEJLŐDÉSÉNEK FŐBB JELLEMZŐI

A lép a gerincesek legősibb kompartmentalizált egyedi perifériás nyirokszerve. Főbb részei a halaktól kezdődően egészen az emlősökig nagymértékű hasonlóságot mutatnak, ugyanakkor viszonylag közeli emlős fajok (pl. egér, patkány és ember) lép-szerkezete között is jelentékeny eltérések mutathatók ki (**3.1. ábra**). Az értekezés fő témája a lép kialakulását irányító morfogenetikai faktorok szerepének vizsgálata, aminek megértését segítheti elő az egér lép szerkezeti és fejlődési jellemzőinek részletes bemutatása.

3.1. A LÉP ALAPVETŐ STRUKTURÁLIS ÖSSZETEVŐI EMBERBEN ÉS EGÉRBEN

A limfoid szerveződés számára a váz legfontosabb elemét lépben az **érhálózat** és a **retikuláris fibroblaszt hálózat** alkotja. Az extracelluláris mátrix és a retikuláris sejtek együttesen hozzák



3.1. ábra: A lép szerkezetének sémája különböző gerinces fajokban
Egyes részleteik eltérései ellenére a lép vaszkuláris alapváza körül elrendeződő limfoid régiók szerveződése nagymértékben hasonló (c. art, centrális arteriola; WP, fehér pulpa; PALS, periarterioláris limfoid hüvely; DZ, sötét zóna; LZ, világos zóna; RP, vörös pulpa; PWP, periellipszoidális fehér pulpa; SSS, Schweiger-Seidel hüvely; MZ, marginális zóna; MnZ, köpenyzóna; PFZ, perifollikuláris zóna; B-sheath, B-sejtes hüvely; MS, marginális szinusz; MZBCh, marginális zóna híd-csatornák). *(Balogh és Lábadi: Structural Evolution of the Spleen in Man and Mouse. In: Developmental Biology of Peripheral Lymphoid Organs, (Ed. Balogh, P) 2011, p. 121-141. Springer-Verlag Berlin Heidelberg)*

létre a lép **conduit** „csőváz" rendszerét, ami sejtmentes, kismolsúlyú oldott összetevők számára nyújt transzport-útvonalat.

A lép-artéria bizonyos számú megoszlását követően a kisméretű centrális arteriolákat a főként T-sejtekből álló PALS veszi körül, míg a B-sejt dús nyiroktüszők viszonylag kevés érképletet tartalmaznak, bár néhány arterioláris ág vagy kapilláris áthalad rajtuk. Ez a két fő kompartment alkotja a fehér pulpát, amit a vörös pulpától a marginális zóna (MZ) választ el (vagy kapcsolja össze). Ezen utóbbi részlet jelentősen különbözik a humán és rágcsálók között (Steiniger és Barth, 2000; Mebius és mtsai, 2004).

Egérben a MZ a MAdCAM-1-pozitív marginális szinusz (Kraal és mtsai, 1995) és az azt körülvevő MZ makrofág rétegek, valamint a közöttük található MZ B-sejtek együtteséből épül fel (Martin és Kearney, 2002). A humán lépben nincs marginális szinusz. Az egér MZ makrofágok a Sn/CD169, SIGN-RI és MARCO antigének, valamint a M-CSF (makrofág kolónia-stimuláló faktor) függésük alapján legalább két különböző alcsoportot tartalmaznak. A Sn-pozitív metallofil makrofágok a fehér pulpához kapcsolódva helyezkednek el a MAdCAM-1-pozitív marginális szinusz mentén, míg a $MARCO^{+}$/$SIGN\text{-}R1^{+}$ MZ makrofágok perifériásabban találhatók. A humán lépben a $CD169^{+}$ makrofágok a perifollikuláris sávban helyezkednek el, ami nincs egér lépben (Steiniger és mtsai, 1997). Fenotípusuk alapján emberben a MZ B-sejteknek megfelelő alcsoport a nyirokcsomókban és a PP-ban is jelen van (Tierens és mtsai, 1999), ugyanakkor rágcsálókban hasonló B-sejt alcsoportot nem találtak a lépen kívül.

A centrális arteriolák legkisebb ágai áthaladnak a fehér pulpán, és onnan vagy a vörös pulpa szinuszokban folytatódnak (humán), vagy a marginális zónában (egér) végződnek. A marginális szinusszal nem rendelkező humán lépben néhány ág a perifollikuláris zónában végződik, míg mások a vörös pulpa gyűjtővénáihoz kapcsolódnak. Az arterioláris kapillárisok némelyike körül többrétegű makrofág-dendritikus sejt-fibroblaszt összetételű ellipszoid (Schweiger-Seidel) hüvely található (Steiniger és Barth, 2000). Az itt elhelyezkedő endotél sejtek mind emberben, mind egérben nagyfokú heterogenitást mutatnak (Steininger és mtsai, 2007; Balázs és mtsai, 2001).

Az érpályák mellett a fehér pulpa néhány emlős fajban efferens nyirokereket is tartalmaz, amik elektronmikroszkópos leírások szerint vékony falú és bazálmembrán nélküli kapilláris képletek, elsősorban a fehér pulpa centrális arteriolái mentén. Ezeknek a képleteknek a helyi folyadék-transzportban és leukocita-recirkulációban betöltött szerepe egyelőre tisztázatlan (Pellas és Weiss, 1990).

A mezenhímális alapváz az érpályákat veszi körül, és az egész szervet átfogó, simaizomsejtekből, miofibroblasztokból és retikuláris fibroblasztokból, valamint az általuk termelt extracelluláris matrix-összetevőkből álló háromdimenziós hálózatot alkot. Bár korábban passzív strukturális szövetalkotónak tartották, a retikuláris fibroblasztok (FRC) fontos szerepet töltenek be a limfociták regionális kompartmentalizációjához vezető irányított mozgás fenntartásában. A T-sejt zóna sűrű retikuláris rendszert tartalmaz, amely a T-sejteket vonzó CCL19 és CCL21 kemokineket termeli (Luther és mtsai, 2000).

A nyiroktüszők retikuláris összetevője komplexebb, mint a T-sejtes régióké, mert a nem-hematopoetikus összetevőik FDC és kisebb részben egyéb, FDC-től eltérő fenotípusú retikuláris sejtes komponenseket is tartalmaznak (Link és mtsai, 2007). Az FDC hálózat a CXCL13 termelés révén képes a nyiroktüszőbe vonzani a B-sejteket és a follikuláris T-helper sejteket (Ansel és mtsai, 2000).

A fent bemutatott főbb összetevők mellett további, szintén egy anatómiai kompartmentre jellemző egyéb FRC alcsoportok jelenlétét igazolták, így a lép és nyirokcsomók nyiroktüszőinek perifériás részén elhelyezkedő populációt is (Balogh és mtsai, 2004; Katakai és mtsai, 2008). Ez az összetevő – újabban MRC (marginal reticular cells) névvel ellátva – a fehér pulpát fogja körül, és a marginális szinusz, valamint a perifollikuláris tér specifikus stróma-összetevőjének tekintjük. Emberben a megfelelő terület a perifollikuláris zóna, amely MAdCAM-1 glikoproteint kifejező fibroblasztokat tartalmaz (Steiniger és mtsai, 2001). A MAdCAM-1 addresszint számos nem-hematopoetikus sejt kifejezheti (differenciálatlan stromális mezenhíma, endotél, fibroblasztok/MRC, FDC), ezért a sejtvonal azonosítására önmagában nem alkalmas. Rágcsálókban a MZ nem zárja körül teljesen a fehér pulpát, benne néhány nyílás/átjáró található, amiket a nemzetközi szakirodalom MZ bridging channel néven ismer. Ezeken a helyeken a T-sejt zóna a vörös pulpa közvetlen szomszédságában helyezkedik el (Mitchell, 1973; Bajénoff és mtsai, 2008), ahol a marginális szinusz és a FRC-gazdag T-zóna közötti közvetlen kapcsolat lehetővé teszi a limfociták számára az érpályából való kilépésük után a PALS vagy nyiroktüsző irányú vándorlást.

Az elmúlt időszakban az érett, nyugvó fehér pulpa stróma-összetevőin kívül az immunizálást követően megjelenő új alcsoportokat írtak le. Így lépben és nyirokcsomóban T-dependens antigénnel történő immunizálás után a T-sejt zóna perifériás részében egy CXCL13 kemokint termelő VSC (versatile stromal cells) alcsoport azonosítható, ami eltolja a T/B zóna stromális határát (Mionnet és mtsai, 2013), illetve a csíracentrum sötét zónájában megjelenő, CRC (CXCL12-secreting reticular cells) alcsoport, ami a centroblaszt migráció finomabb szabályozásához járul hozzá (Rodda és mtsai, 2015).

A lép fehér pulpa korábban már ismert retikuláris vázának kevésbé részletesen feltárt szerveződési formája a folyadék és oldott anyagok szállítását végző csatorna („conduit") rendszer (Nolte és mtsai, 2003). Ezt a tubuláris rendszert elsőként a nyirokcsomók T-sejt zónájában írták le (Gretz és mtsai, 1996), amit fibroblasztokból álló, bazálmembránnal körülvett kötegek alkotnak. A csövek tengelyét kollagénszálak képezik, amelyeket egymással, az őket szintetizáló fibroblasztokkal, valamint a külső bazálmembránnal számos extracelluláris mátrix összetevő kapcsol össze (Lokmic és mtsai, 2008). Ezen struktúrák jelenléte a nyirokszövetekben egyidejűleg szeparálja az extravaszkuláris téren belül a folyadék-fázist körülbelül 70 kDa molekulatömegig a leukociták által alkotott parenchyma összetevőtől, és molekuláris szűrő funkciója révén korlátozza a sejtekhez eljutó oldott összetevők méretét. Ennek a képletnek az egyik feltételezett funkciója a homeosztatikus kemokinek megosztása, ugyanakkor jelenleg nem ismert ezeknek a faktoroknak a limfociták általi elérhetősége a viszonylag elzárt struktúrán belül. Bizonyos szakaszokon a fibroblasztok közötti réseknél dendritikus sejtek helyezkednek el,

I. táblázat

Marker	Molekuláris jellemzők és funkciók	Kifejeződés a retikuláris-vaszkuláris alapvázban	LT-függés
ER-TR7	„Conduit" komponens	Fehér pulpa, marginális zóna, vörös pulpa	+
BP-3/CD157	GPI-kapcsolt antigén, ektoenzim	Follikuláris FRC, T/B határterület	+
Podoplanin/gp38	Mucin-típusú glikoprotein CLEC-2 (trombocita) ligand	T-zóna FRC, T/B határterület	+
MAdCAM-1	PP és hasi nyirokcsomó homing addresszin	Marginális zóna (MRC) és nyirokcsomó szubkapszuláris szinusz alap	+
L1/NCAM	Ig-szuperfamília tag, sejt-adhézió	Marginális zóna	Ismeretlen
CCL19, CCL21	Homeosztatikus kemokinek T-sejtek és dendritikus sejtek számára	T-zóna FRC	+
CD31/PECAM-1	Az Ig-szuperfamília ITIM-tartalmazó tagja, adhéziós molekula (CD38 és heparin-függő proteoglikánok)	Centrális arteriola endotél (intenzív), fehér pulpa arterioláris szegmentumok, marginális szinusz és vörös pulpa szinusz alcsoport (gyenge)	-
CD144/VE-cadherin	Az endotél sejtek Ca-dependens adhéziója	Centrális arteriola, fehér pulpa arterioláris szegmentumok, marginális szinusz és vörös pulpa szinuszok	-
VEGFR-2/flk1	VEGF receptor	Centrális arteriola, fehér pulpa arterioláris szegmentumok, marginális szinusz és vörös pulpa szinuszok	+
Stabilin-2	Hyaluronane receptor	Vörös pulpa szinuszok	Ismeretlen

amelyek nyúlványaik révén érzékelhetik a conduit kemokin-grádiens jellemzőit (Bajenoff és mtsai, 2006). Jelenleg nem ismert, hogy a humán lépben kimutathatóak-e hasonló szerkezetű és feltételezett funkciójú összetevők.

A vörös pulpa szerkezetének részletei kevésbé ismertek. Fő strukturális elemei a vörös pulpa Billroth-kötegei, amiket elsősorban fibroblasztok és makrofágok, kisebb mértékben limfociták és plazmasejtek alkotnak. A plazmasejtek elhelyezkedését a stromális sejtek CXCL12 termelése és az ICAM-1:LFA-1 interakció révén létrejövő integrin-közvetítette retenció szabályozza (Hargreaves és mtsai, 2001; Ellyard és mtsai, 2005), míg a helyi makrofágok általában rezidens sejtek. A vörös pulpa kötegekben szintén kimutathatók vénás szinuszoidok és az ecset-arteriolák terminális ágai, amelyek a lép vérkeringésének nyitott szegmentumát alkotják. Ebben a szakaszban a vénás szinuszoidok bazálmembránja fenesztrált, valamint az endotélsejtek között résszerű nyílások találhatók, ami elősegíti a fehérvérsejtek érpályából való kilépését. A vénás szakaszok nagyobb gyűjtővénákhoz kapcsolódnak, amelyek a trabekuláris vénákat hozzák létre. A szinuszrendszeren való kilépés és visszalépés a vérsejtek bizonyos fokú rugalmasságát igényli, ezért a károsodott és fokozottan fragilis sejtek a vérpályán kívül rekednek, ahol a helyi makrofágok távolítják el őket.

Az egér lép fibroblasztos-retikuláris és érpálya-asszociált stromális markereit az **I. táblázat** foglalja össze.

3.2. A lép korai fejlődésének transzkripcionális szabályozása

Az egér lép fejlődését három fő szakaszra oszthatjuk. Az első szakasz a dorzális mezogasztrium bal felszínének mezenhímális kondenzációjával kezdődik, ami során a gyomor hátoldalán az organizátorként működő szplanchnikus mezodermális lemez (SMP) mentén alakul ki a lép kezdemény (Hecksher-Sørensen és mtsai, 2004). A második szakaszban a lép-kezdeményben hematopoetikus sejtek telepszenek meg, aminek eredményeképpen a fejletlen vörös pulpa és kezdetleges periarterioláris limfoid hüvely (PALS), mint a fehér pulpa elsőként azonosítható részlete jelenik meg. A harmadik szakaszban a születés utáni első hét során érett T- és B-sejtek jutnak nagy mennyiségben a lépbe, és eleinte a periarterioláris limfoid hüvelyben, később attól disztálisan elhelyezkedve az FDC megjelenésével párhuzamosan elkülönül a nyiroktüsző és a T-sejt zóna, és ezen utóbbi vázát alkotó FRC hálózat. A születés utáni harmadik hét környékére jelenik meg a MZ. Ennek megfelelően a szerv fejlődésének jelentékeny része a születés utáni időszakra tevődik, beleértve az immunológiailag fontos limfoid kompartmentek kialakulását, különösképpen a vér-eredetű patogének elsődleges antigén-felvételi helyeként a lépre kizárólag jellemző MZ-t. Az emberi lép ehhez képest gyorsabb fejlődési kinetikát mutat, aminek részeként már a második trimeszter első felére kialakulnak az FDC-t tartalmazó nyiroktüszők és a megfelelő FRC-hálózatattal átszőtt T-sejt zóna (Steiniger és mtsai, 2007).

Az egér lép fejlődésében fontos morfogéneket kódoló gének spontán vagy irányított mutagenezise révén kialakult lép-szerkezeti változások tanulmányozása alapvető információkat nyújtott a lép korai fejlődésének meghatározó összetevőiről. Az egyre bővülő adatok (Brendolan és mtsai, 2007) ellenére azonban ezek hierarchikus kapcsolódása és pontos fejlődésbiológiai szerepe még jelenleg ismeretlen.

A lép blokkolt fejlődését okozó első leírt spontán mutáció a domináns hemimélia (Dh), aminek genetikai háttere egyelőre tisztázatlan. A kórkép végtag-rendellenességek mellett súlyos zsigeri elváltozásokkal jár, benne a lép hiányával (Green, 1967). A Dh-ban megfigyelt léphiány valószínűleg az SMP-t érintő károsodás következtében jön létre (Hecksher-Sørensen és mtsai, 2004).

Az SMP szimmetrikus megjelenését követően a lép előtelep kialakításához egy erőteljes baloldali irányú növekedés indul meg, míg a jobb oldali pár néhány napon belül elsorvad. A balra történő dominancia kiváltásában a bal-jobb tengely kialakításáért felelős Pitx2 és Barx1 transzkripciós faktorok irányította szignalizációs kaszkád a felelős (Patterson és mtsai, 2000; Kim és mtsai, 2007). A folyamat során fontos szerep jut a Bapx1/Nkx3.2 homeodomén-típusú transzkripciós faktor (Hecksher-Sørensen és mtsai, 2004) által kontrollált fibroblaszt növekedési faktor 9 és 10 (FGF9 és FGF10) grádienseknek, amik hiánya szintén léphiányt okoz (Lettice és mtsai, 1999). Ezt a folyamatot egyelőre ismeretlen mechanizmus révén az emlős C-tí-

pusú Sox transzkripciós faktor családba tartozó Sox11 is befolyásolja (Sock és mtsai, 2004). A baloldalra történő fokozott növekedés mellett a lépkezdemény elülső része a gyomorhoz kerül közelebb, amiben résztvevő irányjelző kemotaktikus vagy egyéb migrációs faktorok egyelőre ismeretlenek (Burn és mtsai, 2008). Bapx1-deficiens egerekben a szintén SMP-ből differenciálódó hasnyálmirigy és lép szeparációja elmarad, helyette a hasnyálmirigy endoderma és a lép-előtelep mezenhíma metaplasztikus jellegű átalakulás révén bél-szerű struktúrákat hoz létre, amiben a Sonic hedgehog (Shh) útvonal is szerepet játszhat.

A Bapx1 a lépfejlődésben részt vevő transzkripcionális hálózat egyik fontos szabályzó tagjaként is szerepel. Így egyik fontos célgénje a Hox11/Tlx1, ami az első homeodomén gén volt, aminek célzott kiiktatása léphiányt okozott (Roberts és mtsai, 1994). Normál lépfejlődés során a Bapx1 kifejeződése megelőzi a Hox11/Tlx1 kifejeződését, és Bapx1 hiányban a Hox11/Tlx1 sem expresszálódik, ami a Bapx1 irányító szerepére utal. Ugyanakkor a Hox11/Tlx1 szükséges a Wt1 (Wilms tumor szuppresszor gén) kifejeződéséhez, aminek hiánya szintén léphiányt okoz, valószínűleg a lép előtelep mezenhíma sejtek osztodásának elmaradása miatt (Dear és mtsai, 1995; Koehler és mtsai, 2000). A Bapx1 hiánya ugyanakkor nem befolyásolja az Nkx2-5 homeodomén transzkripciós faktor kifejeződését, ami alapvető kardiogén hatásai mellett szintén szükséges egy Bapx1-independens módon zajló lép-morfogenezist szabályzó folyamathoz (Brendolan és mtsai, 2005).

A fentiektől eltérő (harmadik, illetve alternatív Bapx1-dependens) útvonal is részt vesz a lép fejlődésében, ami bizonyos mértékig megfelel a Bapx1 által irányított transzkripciós hierarchiának. A Pbx1 homeobox gén inaktiválását követően kialakuló léphiányban a SMP fennmarad (ami hiányzik a Dh mutáció esetén), ennek ellenére a lép előtelep nem alakul ki. A Pbx1 a TALE (three–amino acid loop extension) homeodomén transzkripciós faktor család tagja, aminek aktivitása számos zsigeri szerv kialakulásához szükséges. Pbx1 hiánya esetén a Hox11/Tlx1, Wt1 és Nkx2-5 kifejeződése elmarad, ugyanakkor a Bapx1 továbbra is expresszálódik. Úgy tűnik, hogy a Hox11/Tlx1 és Wt1 közbeiktatott géneket a Bapx1 és Pbx1 egymástól függetlenül nem-redundáns módon szabályozza. A Pbx1-irányította útvonal a Bapx1 hatásától eltérően nem a lép előtelep perifériás-kapszuláris részében, hanem a mélyebben elhelyezkedő sejt-csoportosulások differenciálódásában játszhat fontos szerepet (Brendolan és mtsai, 2005).

Azon kívül, hogy az Nkx2-5 elsődleges szabályzóként önmagában is fontos szereplője a lép organogenezis elindításának, egy további Pbx1-independens útvonalon közbeiktatott módon is részt vehet a folyamatban. A bHLH (basic helix-loop-helix) családba tartozó, a célszekvenciához való kötődés során homo- vagy heterodimerizálódó komplexeket képző Pod1/capsulin/Tcf21 transzkripciós faktor hiánya úgy vezet léphiányhoz, hogy következtében elmarad az Nkx2-5 expressziója (Brendolan és mtsai, 2005). Ezek alapján a lép fejlődése egy igen komplex elrendeződésű, számos helyen nem-redundáns átfedésekből és összekapcsolódásokból álló transzkripciós hálózat révén jön létre, melyek közül a Bapx1 hatása a Hox11/Tlx1-Wt1 útvonal mentén valósul meg, az Nkx2-5 részvétele nélkül. Az ettől függetlennek tűnő Pbx1 szerepe kettős, egyrészt Bapx1-független módon aktiválhatja a Hox11/Tlx1-Wt1 útvonalat,

másrészről aktiválhatja az Nkx2-5 kifejeződését. Hasonló módon elsődleges szabályzóként iniciálhatja a lép-fejlődés Nkx2-5-függő eseményeit a Pod1 is.

A Hox11/Tlx1 11,5. embrionális napon történő kifejeződése a lép előtelep szubszerozális mezenhímájának a lép-irányú elköteleződését jelzi. Ez a folyamat a retinsav metabolizmus részvételével elősegíti a helyi érpálya expanzióját (Lenti és mtsai, 2016), és azt a bél endodermális és mezodermális csíralemez-származékai közötti kölcsönhatások résztvevői is befolyásolhatják, elsősorban az endodermális eredetű Shh. Az Shh és Indian Hh hiánya szükséges az előbél meghatározott hátulsó szegmentumában a hasnyálmirigy-lép potenciál fenntartásához (Apelquist és mtsai, 1997), amiben a Shh/Ihh szignalizáció kizárása valószínűleg az aktivin ActRII receptorán keresztüli felismeréshez kapcsolódik (Kim és mtsai, 2000). Az ActRIIA és ActRIIB a TGFβ szupercsaládba tartozó aktivin ligandok, hatásuk Smad2, Smad3 és Smad4 komplexképződés révén érvényesül (Abe és mtsai, 2004). Az Shh szignálok modulálása mellett az ActRIIB a Nodal ligand megkötése révén fontos szerepet tölt be a lépnek a bélcső bal oldalára történő áthelyezésében (Oh és Li, 2002). Az Shh szignalizáció, az ActRII receptor funkciók FGF8 mint szolúbilis faktor, valamint a Bapx1, mint a bal-jobb aszimmetria egyik lehetséges célgénje közötti összekapcsolódás egyelőre nem feltárt (Schneider és mtsai, 1999; Koss és mtsai, 2012).

A lép mezenhíma specifikációját követően megfigyelhető vaszkuláris expanzió a 15,5. embrionális nap idején összekapcsolódik az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor aktiválódásával (Pabst és mtsai, 1999; Wang és mtsai, 2000). Az Nkx2-3 a MAdCAM-1 promóterének egyik transzaktivátor hatású szabályozója, ami szerepet játszhat a MZ defektusában az Nkx2-3-hiányos egerekben (Pabst és mtsai, 2000). Az Nkx2-3 hiánya a PP fejlődését is befolyásolja (Wang és mtsai, 2000). Az Nkx2-3 posztnatális helyi limfoid neogenezisben betöltött szerepére utalhat a promóterben lévő SNP variánsainak előfordulása gyulladásos bélbetegségekben (Cho, 2008).

3.3. A lép előtelep kialakulása, a vörös pulpa és a fehér pulpa elkülönülése

A lép előtelepének a gyomorfaltól és a dorzális hasnyálmirigy-kezdeménytől való elkülönülése során intenzív vaszkularizáció zajlik, ami többféle endotél-markerrel rendelkező ér-szegmentumok kialakulásához vezet. Az embrionális artériák VE-kadherin, CD31 és Tie-2 markereket hordoznak, ugyanakkor a MECA-32 endoteliális antigén nem mutatható ki, míg a kapillárisok VE-kadherint és MECA-32 epitópot hordoznak. A fejlődő érelemek ezek mellett MAdCAM-1 és ICAM-1 adhéziós molekulákat hordoznak, az arteriolákat VCAM-1$^+$ retikuláris sejtek veszik körül (Vondenhoff és mtsai, 2008). Az arterioláris endotél sejtek CCL19, CCL21, CXCL12 és CXCL13 kemokineket termelnek, míg a perivaszkuláris stromális sejtek csak az utóbbi két faktorral rendelkeznek. Feltehetően ezen kemokinek jelenlétének hatására a perivaszkuláris mezenhíma perifériás részében LTi fenotípusú (CD4$^+$/CD3$^-$/IL-7Rα$^+$/RORγt$^+$) limfoid sejtek akkumulálódnak a 13,5. embrionális napot követően (Withers és mtsai, 2007). Emellett az

embrionális lép stromális mikrokörnyezete elősegíti a posztnatális korban makrofág fenotípust mutató mieloid prekurzorok expanzióját is (Bertrand és mtsai, 2006).

Közvetlenül születés után a lép arteriolák mellett szerveződő, MAdCAM-1 és VCAM-1-pozitív FRC és simaizom-sejtek laza hálózatából álló fehér pulpa állománya nem mutat semmiféle felnőttre jellemző territoriális szerveződést (Withers és mtsai, 2007). Az FRC fehér pulpa perifériás része felé történő vándorlásával párhuzamosan egyre nagyobb számban telepszenek meg (eleinte többségében $CD5^+$/B-1) B-sejtek és T-sejtek (Balogh és mtsai, 2004; Wen és mtsai, 2005). Jelenlétükkel biztosítják a follikuláris stróma (elsősorban FDC) indukciójához szükséges LT/TNF ligandokat (De Togni és mtsai, 1994; Pasparakis és mtsai, 1996; Matsumoto és mtsai, 1996; Alimzhanov és mtsai, 1997; Koni és mtsai, 1997).

A B-sejtek akkumulációja és a follikulusok FDC-differenciálódásához kapcsolódó kialakulása két különböző szignalizációs folyamat eredményeként zajlik. A korai időszakban az elsődleges stimulust a LTβR ligand-kötése és az ahhoz kapcsolódó nem-kanonikus NF-κB NIK-RelB útvonal nyújtja. Az éretlen FDC előalakok 3 napos egérben a fehér pulpa széli részében csoportosulnak, és feltehetően a TNF-RI aktiválását követően a fejlődő follikulusba vándorolnak a posztnatális első hét során (Pasparakis és mtsai, 2000). Így a follikuláris stróma-elemek differenciálódása egyrészről a funkcionális specializálódásukat (pl. komplement-receptor kifejeződés, valamint fokozott mennyiségű CXCL13 termelés), másrészt a fehér pulpa centrális része felé irányuló fizikai áthelyeződésüket kapcsolja össze. Az FDC-M1, mint az egér FDC és előalakjainak (Balogh és mtsai, 2001) kimutatására egyik gyakran használt marker Mfge8 (milk fat globule epidermal growth factor 8) ismert foszfatidil-szerin kötő molekulaként való azonosítása várhatóan további lehetőséget teremt ezen sejtvonal korai szakaszát célzó fate-mapping analízisre (Kranich és mtsai, 2008).

A B-sejtek fejlődő lépben történő posztnatális felhalmozódása a CCL19 és CCL21 kemokinek FRC általi fokozott termelődéséhez is szükséges, amelyek a T-sejteket vonzzák a fejlődő T-sejt zónába (Ngo és mtsai, 2001). Az FDC-áthelyeződéshez hasonlóan az FRC összetevők is szerkezeti átrendeződést mutatnak a PALS posztnatális első két hét során lejátszódó érésében, aminek során az FRC-k a PALS-ban, valamint a nyiroktüszőket a marginális zónától héjszerűen elhatároló rétegben dúsulnak fel (Balogh és mtsai, 2004). Bár a B-sejtek fontos szerepet töltenek be a fehér pulpa és marginális zóna stromális szerkezetének kialakításában, egyelőre nem ismert, hogy ezt az aktivitást a B-sejtek milyen érettségi (érett vagy éretlen/tranzicionális) állapotukban vagy alcsoport-elkötelezettségük alapján (B-1 vagy a B-2 sejtvonalon belül follikuláris vagy marginális zóna) képesek előmozdítani. A születés utáni első hét során a lép B-sejtek túlnyomó része a B-1 sejtcsoporthoz tartozik (Wen és mtsai, 2005), és ezek erős CXCR5 kifejeződése predisponálja ezen sejteket a kis mennyiségű CXCL13-termelő FDC előalakokkal való kontaktus kialakítására, a kevesebb CXCR5-expresszáló és többségében éretlen/tranzicionális B-2 sejtekkel szemben.

Az újszülött egerek lépének érszerkezete eleinte semmiféle elkülöníthető mintázatot nem mutat, a viszonylag kevés számú B-sejt elsősorban a későbbi centrális arteriolák mentén rendeződik el, bár a vörös pulpa területében kiterjedt szinusz-hálózat mutatható ki. A lép nagymértékű

II. táblázat

Fejlődési jellemzők	Lép	Nyirokcsomók
A szövetkezdemény kialakulása	A gyomor falszakasz és a hátsó mezogasztrium egy régiójára korlátozódik	A szervezetben több helyen egymást követően
Az érpályához való viszony	Arterioláris ágak mentén	A fejlődő nyirokkapillárisokhoz kapcsolódóan
LTi sejtektől függ	Nem	Igen
LTα és LTβR függés	Nem*	Igen
HD és egyéb transzkripciós faktoroktól való függés (Hox11/Tlx1, Bapx1/Nkx3.2, Pbx1, Wt1, POD-1/capsulin)	Igen	Ismeretlen/nem
Homeosztatikus kemokinektől való függés (CXCL13, CCL19/21)	Nem*	Igen

* Mint különálló szerv, függetlenül egyes régióinak szerkezeti defektusaitól.

növekedése az ellátó érképletek expanzióját teszi szükségessé új erek megjelenésének elősegítésével. Ebben a folyamatban szereplő fontos angiogén faktorok az Ang-1, Ang-2 és VEGF, aminek megfelelően a felismerő receptoraik (Tie-2 és VEGFR-2) kimutathatók az újszülött lép endotél sejteken (Zindl és mtsai, 2009).

A születést követően a fehér pulpa terület perifériás részén endoteliális csoportosulás figyelhető meg, az első hét végére lazán egymáshoz kapcsolódó endotél-sejtekből álló éretlen marginális szinusz képződik. A marginális szinuszt kialakító sejtek előalakjainak érését és vándorlását a LT/TNF szignalizáció irányítja, amik a posztnatális első napokban érvényesülnek. Egyelőre nem ismerjük a marginális szinusz endotél-sejtekre ható kemotaktikus és adhéziós faktorokat, bár a MAdCAM-1 addresszin szerepet játszhat a sejtek csoportosulásában. Ezen kívül lehetséges, hogy az egér marginális szinusz kialakításában egyéb, nem-endoteliális sejtek is részt vehetnek, miután több, endotél-specifikus promóterrel rendelkező (eNOS vagy vWF) LacZ riporter egérben nem volt a marginális szinusz területében kimutatható expresszió (Aird és mtsai, 1995). Ezek mellett egyéb sejtek, így pl. MZ makrofágok is szerepet játszhatnak a marginális szinusz integritásának fenntartásában, amint azt a makrofág-deficiens egereken kapott eredmények jelzik (Chen és mtsai, 2005). B-sejtek hiányában a marginális szinusz képződése nagymértékben károsodott, és a B-sejtek depletálása is károsítja a kialakult marginális szinusz integritását (Nolte és mtsai, 2004). Ugyanakkor a MZ szerkezeti integritásának nem minden összetevőjét társíthatjuk a helyi B-sejtek jelenlétével, miután a tirozin kináz Pyk-2 vagy az azt szabályzó Rap1b inaktiválása miatti MZ B-sejt hiány esetén a Sn/CD169^{+} metallofil makrofágok normál MZ megoszlást mutatnak (Guinamard és mtsai, 2000; Chen és mtsai, 2008). A lép és nyirokcsomók általános fejlődésbiológiai jellemzőit a **II. táblázat** összegzi.

Az egérben nyert adatmennyiséggel ellentétben az emberi lép korai transzkripcionális szabályzó faktorainak kifejeződéséről szinte semmilyen ismeret nem áll rendelkezésre (Koss és mtsai, 2012), ezek túlnyomó része morfológiai jellegű leírás, ultrastrukturális és immunhisztokémiai adatokkal kiegészítve.

Az érpályák és a limfoid kompartmentalizáció jellemzői alapján a humán lép fejlődését négy szakaszra oszthatjuk (Steiniger és mtsai, 2007). A lép fejlődése az utolsó ovuláció utáni 35-40. napon a mezogasztrium hátsó-bal oldalán kezdődik, aminek a 0. stádiumát retikuláris sejtek és makrofágok csoportosulása jelzi (Ishikawa, 1985).

Az I. szakaszban a lép arterioláris lebenykékre tagozódik (Vellguth és mtsai, 1985). Ebben a szakaszban a lépben található limfoid sejtek többsége B-sejt, amik periarterioláris csoportosulásokat alkotnak.

A 18 és 30. hét közötti II. szakaszban a szinusz-hálózat kiterjedésével egyidejűleg a lobuláris szerkezet felbomlik, a limfoid akkumuláció kifejezettebb lesz, aminek során a T-sejtek elsősorban az arterioláris szegmentumok centrális részében csoportosulnak. Itt egy α-simaizom aktin-pozitív (αSMA) retikuláris sejtes mezenhímából álló hálózatban helyezkednek el, amely sejtjei CCL21 kemokint termelnek, a B-sejtek a perifériás részben halmozódnak fel. Ezek az αSMA-pozitív sejtek a terhesség 26. hete környékén szintén kirajzolják a fejlődő MZ területét (Satoh és mtsai, 2009). Ezzel párhuzamosan a retikuláris-stromális hálózat dúsabbá válik, amiben az αSMA-pozitív retikuláris elemek felritkulásának helyén FDC hálózat jelenik meg. A korábban perivaszkulárisan elhelyezkedő B-sejtek elsősorban a nagyobb arteriolák mentén a T-sejtes környezet közelében és az FDC-csoportosulásokkal együtt rendeződnek el.

A III. stádiumban a lobuláris szerkezet teljesen eltűnik, a fehér pulpa (a perifollikuláris és marginális zóna kivételével) megfelel a felnőtt szerkezetnek. A Sn/CD169^{+} makrofág kötegek az érett szerkezetnek megfelelően feltehetőleg a születés után rendeződnek el, valamint ezen időszakban jelennek meg a különböző fenotípusú (CD141^{+} és CD8^{+}) endotél-sejtekkel bélelt szinusz-összetevők a vörös pulpában (Steiniger és mtsai, 2007).

4. CÉLKITŰZÉSEK

A kutatások célja az egér lép és bél-asszociált nyirokszövetek stromális szerveződésének és a kompartmentalizációjukban részt vevő morfogén szabályzók helyi és általános szerepének részletesebb megismerése volt. Ezen témakörben az alábbi irányokat vizsgáltam:

1. *Az egér lép retikuláris-vaszkuláris stróma-elemeinek azonosítására alkalmas új patkány monoklonális antitestek előállítása, reaktivitásuk elemzése:* Célunk a nem-hemopoetikus (endotél, retikuláris fibroblasztok) sejtek és extracelluláris matrix összetevők pontosabb azonosítására alkalmas monoklonális ellenanyagok fejlesztése volt új immunizálási és tesztelési eljárások kidolgozásával, amelyek révén ezen (megfelelő reagensek hiányában viszonylag kevéssé ismert) szövetalkotókról részletesebb információkhoz juthatunk.

2. *A lép limfoid kompartmentjeiben jellemző stromális alcsoportok (vaszkuláris endotél, follikuláris dendritikus sejtek, T-sejt zóna retikuláris fibroblasztok) posztnatális érési folyamatának és limfocita-kapcsolódási jellemzőinek vizsgálata:* A kifejlesztett és egyéb monoklonális antitestekkel különböző életkorban az egyes markerekkel reagáló sejtek megjelenésének és adaptív (T/B) limfoid sejtektől való függésének meghatározása *in vivo* kísérleti rendszerekben.

3. *A lép morfogenezisét irányító faktorok nyirokszöveti vaszkuláris-stromális szerveződésre gyakorolt hatásának vizsgálata, különösképpen az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor hiányának következményei:* Vizsgáltuk az Nkx2-3 transzkripciós faktor szövet-specifikus szerepét, valamint a limfotoxin béta-receptor (LTβR) aktivitásával való kooperációját a lép stromális szerveződésében és az itt zajló homing folyamatok molekuláris jellemzőinek meghatározásában.

4. *A Peyer-plakkok Nkx2-3 függő magas endoteliális venulák (HEV) érése és a limfoid sejtösszetételre kifejtett hatása DSS-indukálta vastagbél-gyulladás modellben:* A léphez hasonlóan Nkx2-3 kifejeződést mutató Peyer-plakkokon végzett vizsgálataink célja a MAdCAM-1 addresszin transzkripcionális aktivátorának hiányában megfigyelhető nyálkahártya endotél addresszin-kifejeződés jellemzőinek meghatározása, és ezen keresztül a MAdCAM-1 endoteliális jelenlététől független alternatív mukózális homing folyamat meghatározása volt. Emellett vizsgáltuk az Nkx2-3 faktor hiányának az egyéb strukturált bél-asszociált nyirokszövetek fejlődésére és a DSS-indukálta bélgyulladás lefolyására kifejtett hatását, valamint a mukózális nyirokszövet organogenezisben és nyálkahártya-gyulladásokban részt vevő 3. típusú veleszületett limfoid sejtek (ILC3) megoszlását is.

5. *Az egér fejlődéstani vizsgálatok alapján a lép és bél-nyálkahártya Nkx2-3-függő összetevők humán analógjainak vizsgálata, valamint az Nkx2-3 humán B-sejtes limfoproliferatív kórképekben betöltött szerepének vizsgálata:* Vizsgálatunkban a humán lép Nkx2-3-kifejeződést mutató ér-összetevőket jellemeztük endotél-specifikus markerekkel korreláltatva. A vastagbél Nkx2-3-kifejeződést mutató szöveti összetevőit kötőszöveti stromális markerekkel együtt elemeztük, a B-sejtes limfóma kialakulásában és szöveti progressziójában játszott szerepét egy

IgH-Nkx2-3 *t*(10;14)(q24;q32) transzlokációval járó B-sejtes limfóma transzgenikus egér-modelljében (Eμ-*Nkx2-3*) vizsgáltuk.

6. *Egy spontán B-sejtes malignus limfóma terjedése kapcsán egy új típusú nyirokszöveti formáció szerkezet-analízise és a B-sejtek és high-grade B-sejtes limfómák terjedésében betöltött szerepének vizsgálata:* Ebben a munkában a vékonybelet ellátó mezenteriális zsírkötegek szerozális felületén és a nagycsepleszben elhelyezkedő, részlegesen komparmentalizált nyirokszövet (**F**oliate **L**ymphoid **Ag**gregates – FLAg) szerkezetét, sejtes összetételét, homeosztatikus kemokin-szerveződését és a hasűri nyirokkeringéssel kapcsolatos jellemzőit tanulmányoztuk.

5. FONTOSABB MÓDSZEREK

Az alábbi felsorolásban a kutatás során alkalmazott fontosabb módszereket ismertetem, azok részletei, valamint az elvégzésük során felhasznált vegyszerek és reagensek leírása az értekezés alapjául szolgáló közleményekben fellelhetők.

5.1. Monoklonális antitestek előállítása, immunglobulin tisztítás és jelölés

Wistar patkányokat egér lépből vagy nyirokcsomóból izolált limfocitákkal, vagy sztereomikroszkóp alatt mikrodisszekcióval feltárt (korábban humán vörösvértesttel oltott) BALB/c egerekből származó fehér pulpa fragmentummal immunizáltunk, majd az immunizált patkányok lépsejtjeit polietilén-glikol segítségével Sp-2/0Ag14 sejtvonallal fúzionáltattuk. Standard hibridóma HAT-szelekciós eljárást követően a túlélő klónok felülúszóit felhasználva áramlási citometriás vagy indirekt immunhisztológiai eljárással választottuk ki a tervezett vizsgálatok szempontjából releváns klónokat. Klónozást követően a termelt hibridóma felülúszóból az antitesteket Protein G affinitás kromatográfiás eljárással tisztítottuk, a kapott IgG frakciót szükség szerint FITC, Cy3, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 647 vagy biotin-N-hidroszukcinimid-észterrel konjugáltuk.

5.2. Immunhisztológiai vizsgálatok

A vizsgálandó szöveteket Killik fagyasztó médiumba téve lefagyasztottuk, majd kriosztáttal 6-8 µm-es metszeteket készítettünk. A vizsgálatok során általában indirekt immunhisztokémiai/immunfluoreszcens eljárást, vagy többszörös jelölés esetén különböző fluorokrómokkal jelölt antitest-koktélt alkalmaztunk. Kombinált LacZ/β-galaktozidáz:immunhisztokémiai eljárás során X-gal festést és peroxidáz-jelölt kecske anti-patkány IgG felhasználásával indirekt jelölést végeztünk. *In vivo* antitest-kezelés és/vagy jelölés esetén az alkalmazott antitestet Na-azid-mentes pufferbe dializáltuk, és 200-400 µl/recipiens dózisban a farokvénába injektáltuk. A kapott jelölődést Olympus BX61 fény- és fluoreszcens mikroszkóppal vagy Olympus Fluoview FV-1000 laser scanning konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A kapott képeket AnaliSYS morfometriai szoftverrel értékeltük.

5.3. Áramlási citometria

A különböző nyirokszövetekből (lép, nyirokcsomó, Peyer-plakk, csontvelő, tímusz) készített sejtszuszpenziót a vizsgálatok céljának megfelelő antitestekkel jelöltük, majd a jelölt sejteket

1%-os paraformaldehides fixálást követően Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométeren a CellQuestPro szoftverrel mértük és értékeltük.

5.4. Monoklonális antitestek reaktivitásának és epitóp-specificitásának meghatározása

A leukocita membrán-antigénekkel szemben előállított monoklonális antitestek reaktivitását a szöveti/sejtes kötődés meghatározása mellett immunprecipitációval (CD8, CD45, CD11a/CD18, CD90, MHC-II), M13 fág-display eljárással (CD45RC), prediktált antigén-specificitás alapján az antigén cDNS-sel történő transzfekciójával (MARCO), valamint a feltételezett antigénre KO egér lép-vizsgálatával (Sn/CD169) állapítottuk meg.

5.5. Egerek genotipizálása és mRNS kifejeződésének qPCR vizsgálata

Az Nkx2-3 hiányos és a keresztezések során felhasznált egyéb egértörzsekkel (*Ltbr*$^{-/-}$, *Rag2*$^{-/-}$) kialakított kombinált mutáns egerek genotipizálását az eltávolított farokvégből izolált DNS PCR reakciójával, vagy BALB/c^{eGFP} Tg esetén az újszülöttek UV lámpával való megvilágításával végeztük. A nyirokszövetek gén-expressziós vizsgálatához teljes RNS izolálást végeztünk (RNeasy Plus Mini Kit [Qiagen]) és DN-áz kezelés után cDNS-t szintetizáltunk. A tervezett primerekkel (Primer Express Software [Applied Biosystems]) végzett amplifikáció során Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems) felhasználásával három párhuzamos mintában vizsgáltuk a mRNS mennyiséget β-aktin vagy HGPRT referencia génekhez hasonlítva (ABI 7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems).

5.6. Adoptív sejt-transzfer, hematopoetikus kimérák és *in vivo* jelölés

A homing-vizsgálatokhoz különböző nyirokszövetekből limfocita-szuszpenziót készítettünk, majd a sejteket karboxi-fluoreszcein diacetát szukcinimid-észterrel (CFSE, Invitrogen) vagy biotin-N-hidroszukcinimid észterrel (Sigma Aldrich) inkubáltuk. A jelölést szérum hozzáadásával leállítottuk, majd PBS-ben történő ismételt mosás után a sejteket DMEM tápfolyadékos szuszpenzióban a farokvénába oltottuk 200 µl/recipiens térfogatban 1-3x10^7 sejt/recipiens dózisban. A jelölt sejteket különböző időpontokban immunfluoreszcens mikroszkópiával vagy áramlási citometriával vizsgáltuk. Hematopoetikus kimérák kialakításához a recipiens egereket 11 Gy össz-dózisban Co^{60} forrással besugaraztuk, majd xenogén kiméra esetén 5x10^6 patkány csontvelősejttel vagy embrionális máj hemopoetikus sejttel, szingén kiméra esetén BALB/c^{eGFP} Tg egérrel (Kvell és mtsai, 2010) rekonstruáltuk. A kimérizmus mértékét a rekonst-

ruált állatok perifériás vér leukocitáinak faj-specifikus (patkány/egér) CD45 expressziója alapján, szingén egér esetén eGFP/CD45 vizsgálatával áramlási citometriás eljárással határoztuk meg. A peritoneális leukociták *in situ* jelzéséhez DMSO-ban feloldott CFSE törzsoldatot (5 mg/ml) használtunk, melyet PBS-ben hígítottunk 25-50 µg/ml végkoncentrációra. Az ip. oltással végzett jelöléshez 0,5 ml/10 g testsúly dózist alkalmaztunk.

dc_1678_19

6. EREDMÉNYEK

6.1. Új monoklonális antitestek fejlesztése és alkalmazása az egér perifériás nyirokszövetek stromális elemeinek azonosítására

A viszonylag könnyen hozzáférhető hematopoetikus sejtekkel ellentétben a nyirokszöveti sejtes összetevők kb. 3-5%-ának megfelelő stromális komponensek azonosítása, további vizsgálatok céljára történő feldúsítása és izolálása számos technikai nehézségbe ütközik. Ennek kiküszöbölésére választottuk a szövet-fragmentumokkal történő immunizálást, és az új/egyedi nem-hematopoetikus összetevőkkel reagáló ellenanyagokat termelő klónok azonosítására a nagy mintaszámú immunhisztokémiai tesztelést. Ennek során általában 10x96 lyukú szövettenyésztő lemezre osztottuk szét a fúzionált sejteket, melyek antitest-termelését 5-5 minta

III. táblázat

Klón	**Lép stromális immunhisztokémiai reaktivitás**
IBL-7/1	Lép marginális szinusz endotél, fehér pulpa terminális arteriola endotél, vörös pulpa szinusz-alcsoport endotél
IBL-7/22	Fehér pulpa és vörös pulpa ECM retikulum
IBL-9/2	Vörös pulpa szinusz-alcsoport endotél
IBL-10	Fehér pulpa T/B-zóna és marginális zóna ECM retikulum
IBL-11	Fehér pulpa T-zóna és marginális zóna ECM retikulum
IBL-18	Fehér pulpa dendritikus sejtek, vörös pulpa makrofágok és szinusz endotél
IBL-19	Fehér pulpa és vörös pulpa ECM retikulum (IBL-7/22 mintázathoz hasonló)
IBL-20	Fehér és vörös pulpa endotél
IBL-21	Fehér pulpa és vörös pulpa ECM retikulum (IBL-7/22 mintázathoz hasonló)
IBL-22	Fehér pulpa dendritikus sejtek és terminális arteriola endotél, vörös pulpa makrofágok és szinusz endotél
	Hematopoetikus reaktivitás *(azonosított antigén – azonosítás módja)*
IBL-1, IBL-6/13, IBL-6/23	T-sejtek, neurális sejtek (*Thy-1.2/CD90 – áramlási citometria, immunprecipitáció*)
IBL-3/16, IBL-5/25	Leukociták (*CD45 – immunprecipitáció*)
IBL-3/5, IBL-5/22	B-sejtek, tímusz hám, makrofágok (*MHC-II – immunprecipitáció, áramlási citometria*)
IBL-6/2	Leukociták (*LFA-1/CD11a/CD18 – áramlási citometria, immunprecipitáció*)
IBL-8, IBL-27	B-sejtek (*CD45RC – peptid fág display, áramlási citometria, immunprecipitáció*)
IBL-12	Marginális zóna makrofágok (*MARCO: Marginal zone macrophage antigen with collagenous structure – lentivirális rekombináns expresszió*)
IBL-13	Metallofil makrofágok (*szialoadhezin/CD169 – normál és Sn KO lép immunhisztokémia*)
IBL-17	Megakariociták, trombociták
IBL-16	B-sejtek, plazmasejtek (*IgM – immunoprecipitáció*)
IBL-3/25, IBL-25	T-sejt alcsoport (*CD8 – áramlási citometria, referencia antitest-kötődés-gátlás)*
IBL-28	NK-sejtek (*CD49b – áramlási citometria DX5 referencia antitesttel, immunprecipitáció*)

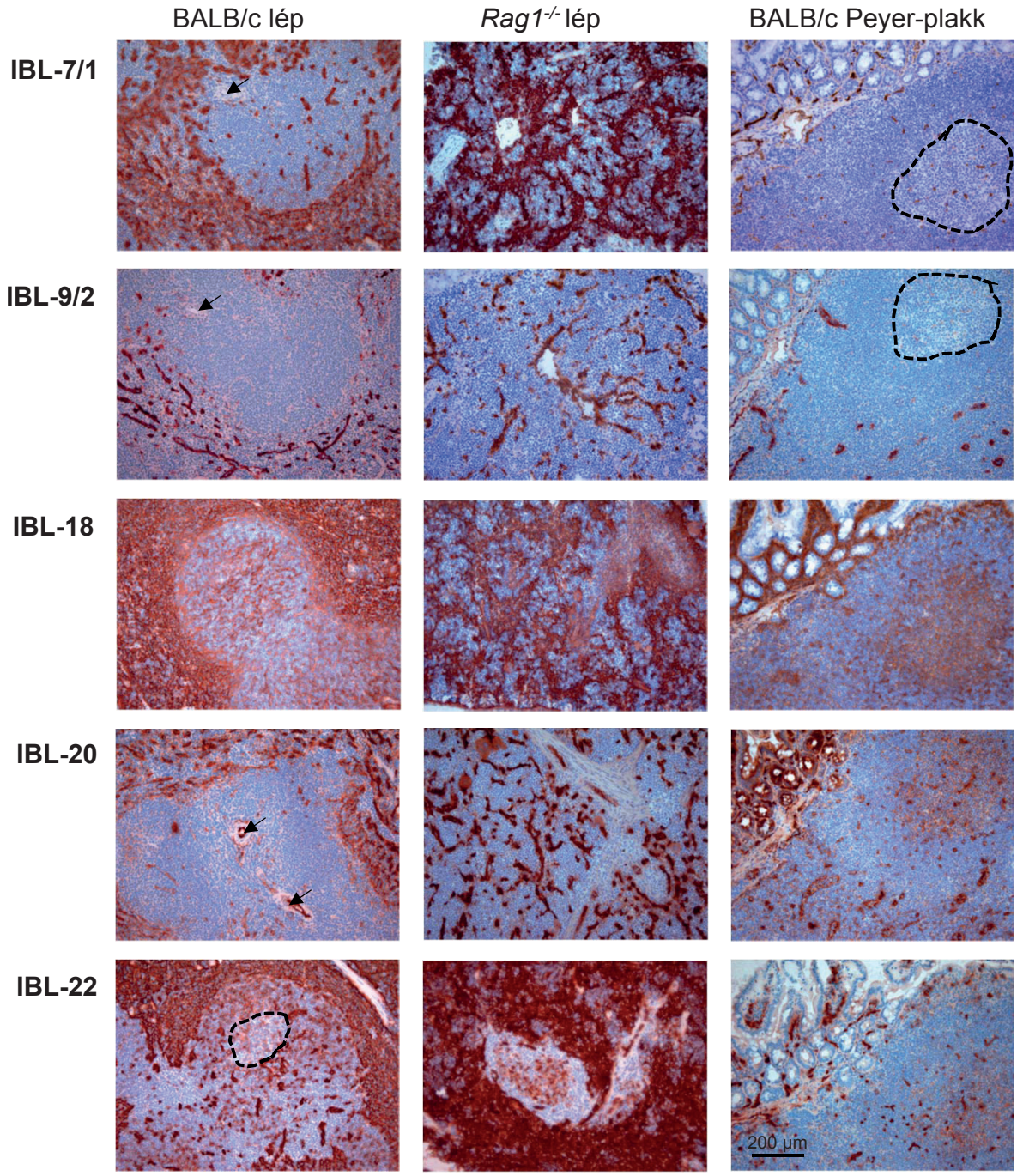
meghatározott rendszer szerinti összegyűjtésével teszteltük fagyasztott lép-metszeteken (4 metszet/tárgylemez, 48 tárgylemez/tesztelés). Az így pozitív festődést adó minta esetén az egyedi lyukakból származó felülúszók megismételt vizsgálatával azonosítottuk a megfelelő hibridóma kultúrát. A klónok kiválasztása során azokat a reaktivitás-mintázatokat (sejtes vagy extracelluláris matrix [ECM]) preferáltuk, melyek szövet- és régió-specifikus stromális jelölődést mutattak. Az összesen 14 fúzió során a **III. táblázatban** felsorolt patkány hibridóma klónokat állítottuk elő.

A leukocita/hematopoetikus sejt-reaktivitású új antitestek többségének specificitását különböző eljárásokkal validáltuk, míg a stromális (endoteliális és fibroblaszt/ECM) reaktivitású monoklonális antitestek (IBL-7/1, IBL-9/2, IBL-18, IBL-20, IBL-22: endoteliális markerek; IBL-7/22, IBL-10, IBL-11, IBL-19, IBL-21: retikuláris fibroblaszt/ECM markerek) antigén-specificitásának megállapítására eddig nem került sor, ezeket munkánkban topográfiai markerekként alkalmaztuk. A szelektív kötődést mutató stromális komponensekkel reagáló antitestek regionális megoszlását T/B-markerekkel korreláltatva többszörös immunfluoreszcens jelölési eljárásokkal határoztuk meg.

A stróma-asszociált sejtfelszíni markerek közül az IBL-7/1 antitest a fehér pulpa terminális arterioláival, valamint a marginális szinusz és a vörös pulpa szinuszainak egy kisebb részével reagált, míg az IBL-9/2 a vörös pulpa domináns szinusz-alcsoportjának endotél-sejtjeihez kötődött, ezzel az antitesttel sem a fehér pulpa, sem a marginális szinusz nem festődött. Az IBL-20 antitest pán-endotél kötődést mutatott, így a centrális arteriola, fehér pulpa kapillárisok, marginális szinusz és a vörös pulpa erezet egyaránt intenzíven festődött. Az IBL-18 és IBL-22 antitestekkel az erőteljes vörös pulpa reaktivitásuk mellett a fehér pulpában kapilláris-dendritikus (IBL-18), illetve elsősorban a kapillárisok mentén elhelyezkedő limfoid reaktivitást (IBL-22) is észleltünk.

A normál egér lépre jellemző festődéssel szemben a T/B-sejt hiányos *Rag1*$^{-/-}$ egerek reaktivitás-mintázata nagymértékben eltért. Az IBL-7/1, IBL-18 és IBL-22 antitestek kötegesebb MZ reaktivitást mutattak, az IBL-9/2 festődés megtartott volt a vörös pulpában, hasonlóképpen az IBL-22 festődéshez. Az IBL-7/22, IBL-19 és IBL-21-reaktív (feltételezhetően ECM) komponensek erőteljesebb köteges periarterioláris, valamint retikuláris és mérsékeltebb intenzitású vörös pulpa-festődéssel T- és B-sejtek hiányában is kimutathatóak voltak SCID illetve *Rag1*$^{-/-}$ egérben.

A lép jellegzetes kompartmentalizált ECM mintázatától eltérően a Peyer-plakkok nyirokszöveti ECM/FRC megoszlása az előállított új monoklonális antitestekkel (IBL-7/22, IBL-10, IBL-11, IBL-19, IBL-21) nem mutatott a T/B-sejtes zónára jellemző jelentősebb eltérést. A lépben megfigyelt régió-szelektív endoteliális reaktivitással szemben az IBL-7/1 a Peyer-plakkokban kiterjedt kapilláris reaktivitást mutatott, a magas endoteliális venulák (HEV) nem festődtek. Az IBL-9/2 a nyiroktüszőn kívüli HEV szakaszokat, valamint kisebb intenzitással a lamina propria kapillárisokat jelölte. Az IBL-20 pán-endotél antitest kapilláris és HEV-reaktivitást mutatott, valamint a hámsejteket is erőteljesen festette. A makrofág/dendritikus sejt/endotél festődést mutató antitestek közül az IBL-18 a Peyer-plakk csíraközpont stromális és a lamina propria kötőszöveti összetevőivel reagált jelentékenyebb vaszkuláris festődés nélkül, míg az IBL-22

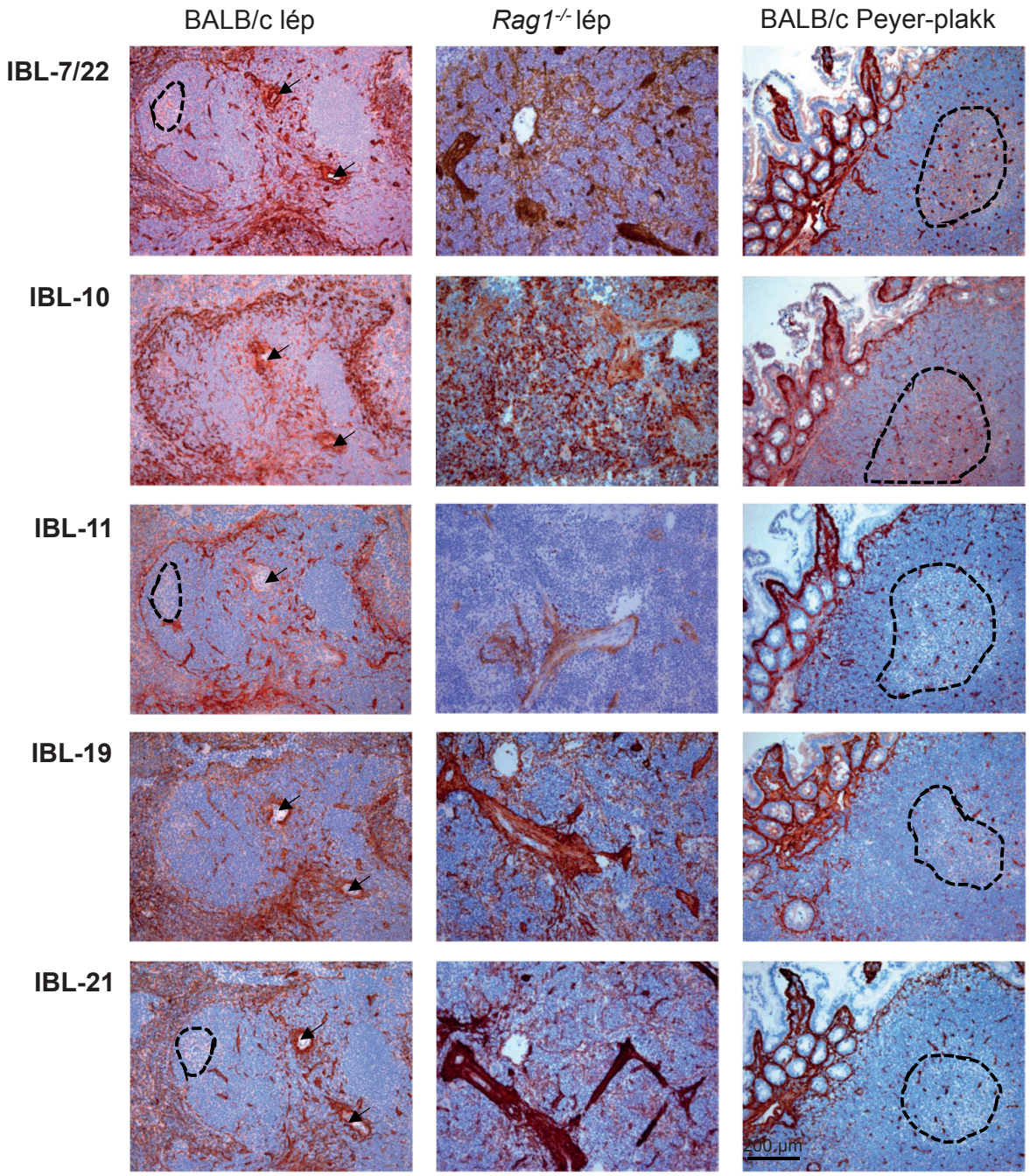


6.1. ábra: Az egér perifériás nyirokszöveti stróma-sejtekkel szemben előállított IBL patkány monoklonális antitestek reaktivitása BALB/c és *Rag1*$^{-/-}$ egér lépben és normál Peyer-plakkban

Az IBL-7/1, IBL-9/2 és IBL-20 antitestek endotél sejteket/alcsoportokat ismernek fel, míg az IBL-18 és IBL-22 antitestek a fehér pulpában dendritikus sejtekkel, a vörös pulpában makrofágokkal is reagálnak. A nyilak a lép mintákban a centrális arteriolát mutatják, a szaggatott vonalak a csíracentrumokat jelzik. Indirekt immunhisztokémiai reakció HRP anti-patkány IgG detektálással és H_2O_2/DAB előhívással (lépték = 200 µm).

antitest az intenzív kapilláris-jelölődés mellett a csíracentrumban mutatott mérsékelt stromális jelölődést. A felsorolt patkány monoklonális antitestek BALB/c és *Rag1*$^{-/-}$ egér lépben és Peyer-plakkokban megfigyelt reaktivitását a **6.1.** és **6.2. ábrák** illusztrálják.

Az előállított új monoklonális antitestek egy részének felhasználásával a kutatásaink során kapott eredményeinket a következő szakaszokban mutatom be. Ezek a vizsgálatok két fő



6.2. ábra: Az egér perifériás nyirokszövet ECM összetevőivel szemben előállított IBL patkány monoklonális antitestek immunhisztokémiai reaktivitása BALB/c és *Rag1*$^{-/-}$ egér lépben és normál Peyer-plakkban

A nyilak a lép mintákban a centrális arteriolát mutatják, a szaggatott vonalak a csíracentrumokat jelzik. Az IBL-7/22, IBL-19 és IBL-21 antitestek reaktivitásának hasonló mintázatával szemben az IBL-10 és IBL-11 antitestek (elsősorban a *Rag1*$^{-/-}$ mintákban) korlátozottabb szöveti reaktivitást mutatnak. Indirekt immunhisztokémiai reakció HRP anti-patkány IgG detektálással és H_2O_2/DAB előhívással (lépték = 200 µm).

irányban történtek. Az egyik a normál egér lép stromális elemek (retikuláris fibroblasztok, endotél-alcsoportok és a nyiroktüsző follikuláris dendritikus sejtjei) posztnatális mintázat-érése, a másik a lép és bél-asszociált nyirokszövetek fejlődésében szereplő Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor nyirokszöveti morfogenezisben betöltött szerepének vizsgálata.

6.2. A lép retikuláris fibroblasztjainak fejlődéstani és regionális heterogenitása

Egyéb mezodermális szövetekhez hasonlóan a lép is kötőszöveti alapváz köré szerveződik. A kötőszövetet alkotó fibroblasztok (FRC) szelektív elkülönítésére leggyakrabban a gp38/podoplanin jelölést alkalmazzák, de ez a marker nem különbözteti meg a fibroblaszt/miofibroblaszt/ marginális retikuláris (MRC) sejteket. A lép kötőszöveti rácsrost-szerkezetének vizsgálatára szintén gyakran alkalmazott marker az ER-TR7 monoklonális antitest (van Vliet és mtsai, 1986) által felismert ECM-összetevő, aminek molekuláris azonosítása eddig nem történt meg. Jellemzően a T-sejt zónában (tömegesen a centrális arteriola körüli régióban) mutat kiterjedt reaktivitást, a nyiroktüsző szegényesebb festődésű, míg a marginális zóna (MZ) és vörös pulpa is gazdagon átszőtt ER-TR7-reaktív hálózatot tartalmaz. Az általunk előállított antitestek közül az IBL-7/22 (Balázs és mtsai, 1999), IBL-19 és IBL-21 antitestek mutattak hasonló reaktivitást (**6.2. ábra**).

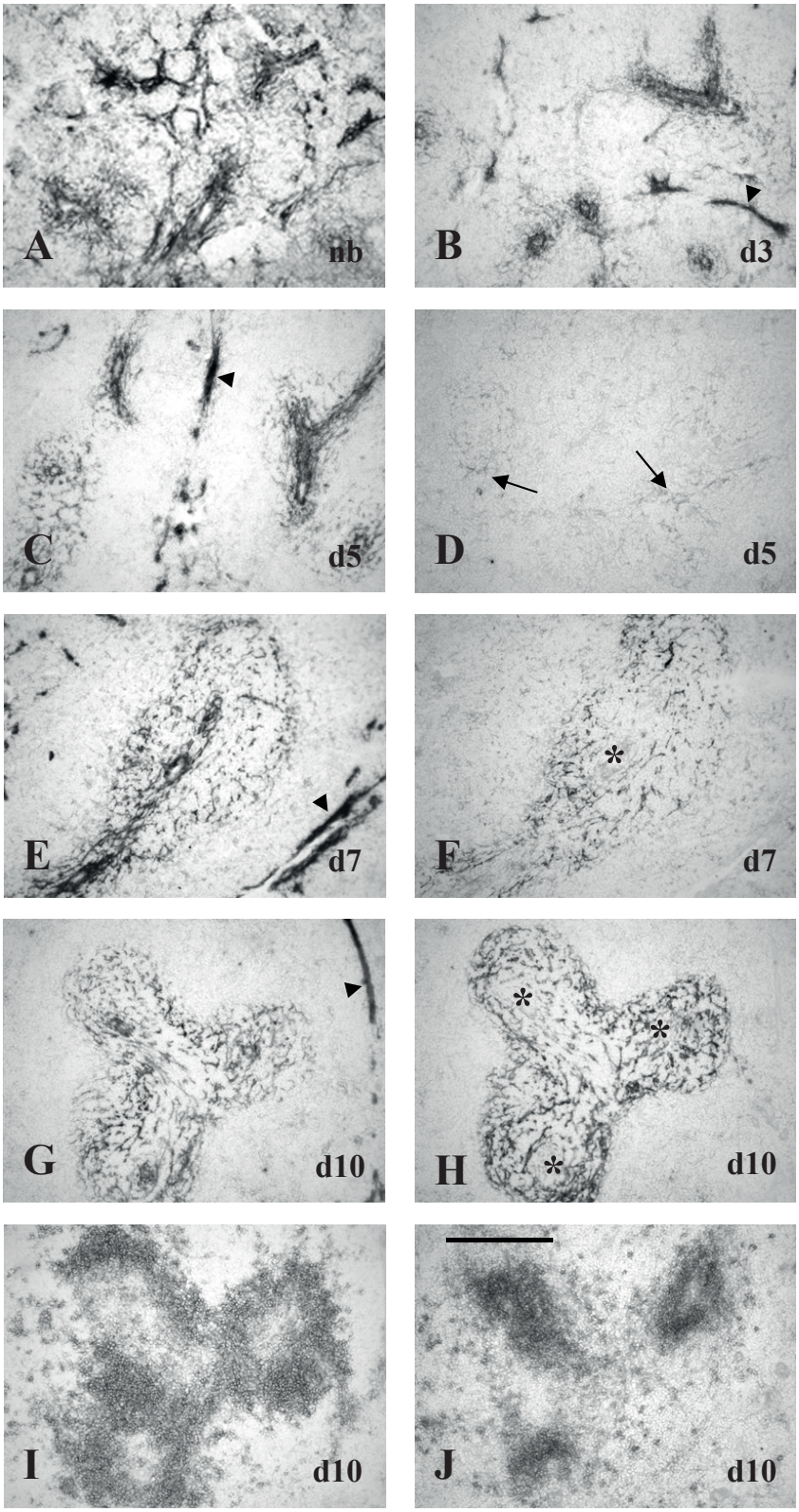
6.2.1. A lép fehér pulpa retikuláris fibroblaszt-váz szerkezeti és fejlődési jellemzői

A fenti markerek pán-fibroblaszt mintázatával ellentétben az IBL-10 és IBL-11 antitestek elsősorban a fehér pulpára és a MZ-ra korlátozódó festődést mutattak (Balogh és mtsai, 2004). Ezek közül az IBL-10 kiterjedtebben reagált a MZ területében és a follikulusban, intenzívebben a nyiroktüsző/T-sejt zóna határterületében, valamint a vörös pulpa trabekulumaival. Az IBL-11 antitest a T-sejt zónában mutatott dúsabb reaktivitást, a nyiroktüszőn belüli festődése minimális volt, a vörös pulpában nem mutatott specifikus kötődést. Ez a mintázat a posztnatális első két hét során alakul ki, az IBL-10 mintázat érése 3-5 nappal megelőzi az IBL-11 antitest felnőttre jellemző reaktivitásának létrejöttét (**6.3. ábra**).

Letális irradiálást követően normál egerekben fennmaradt a két antitest reaktivitása közötti különbség. Bár mindkét antitest által felismert markerek radiáció-rezisztensnek bizonyultak, a fibrilláris reaktivitás helyett vaskos köteges átrendeződést figyeltünk meg. Ebben az IBL-10 antitest a limfocita-depletált fehér pulpa belsőbb részeiben mutatott erőteljes reaktivitást, míg az IBL-11 antitest a fehér pulpa perifériás szegmensének retikuláris állományával reagált fokozottan (**6.4. ábra**).

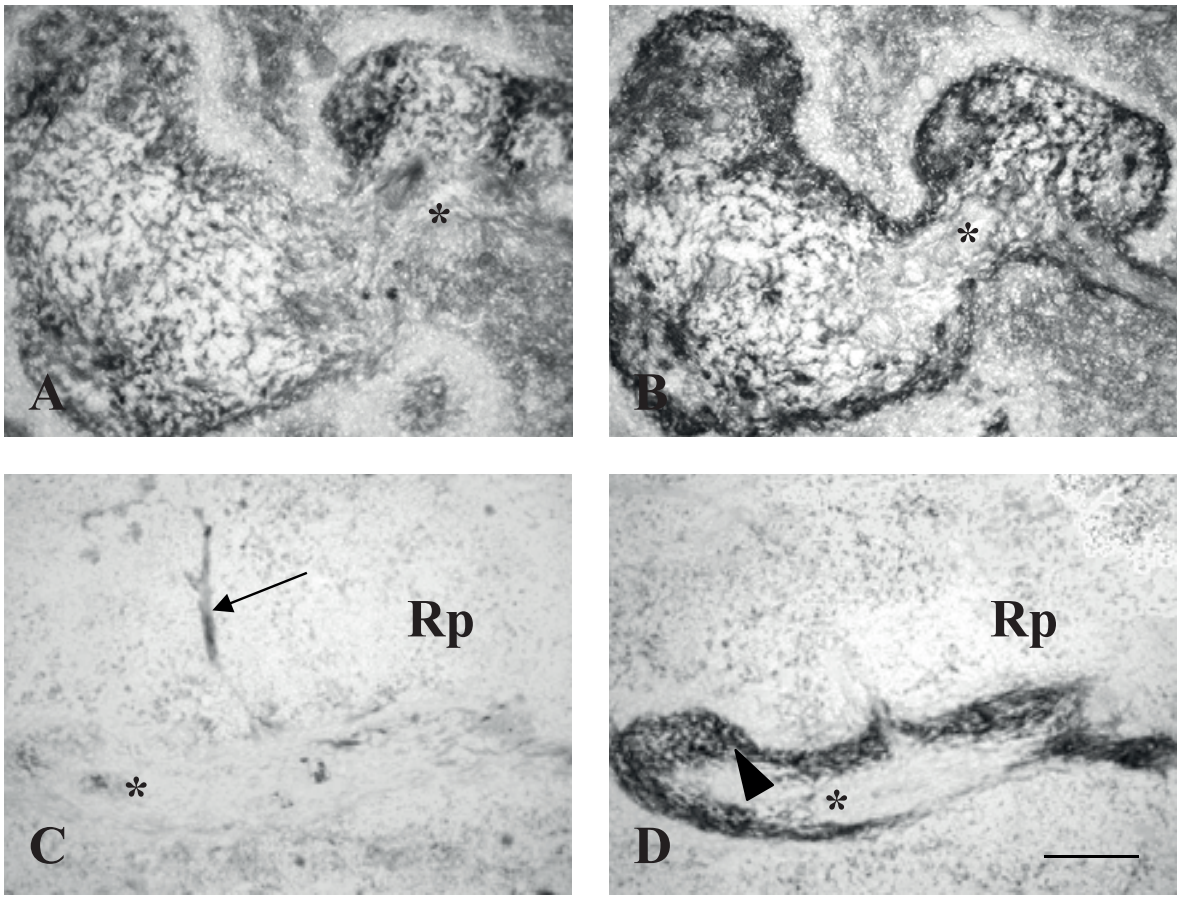
6.2.2. A lép fehér pulpa retikuláris fibroblaszt-váz kompartmentalizáció limfocita-függése

T- és B-sejthiányos SCID egérben az IBL-10 jelölődés a vörös pulpa trabekulumaira korlátozódott, az IBL-11 antitest a centrális arteriolát körülvevő régióban mutatott intenzív festődést. Az IBL-11 antitesttel hasonló reaktivitás-mintázatot kaptunk *Rag1*$^{-/-}$ egérben is, míg az IBL-10 ellenanyag érdekes módon a SCID mintákban megfigyelt gyenge festődéssel szemben a vörös pulpában fokozott reaktivitást mutatott. Tisztított T- illetve B-limfocita transzfert követően SCID



6.3. ábra: A fehér pulpa fibroblaszt-kompartmentek posztnatális fejlődése egér lépben

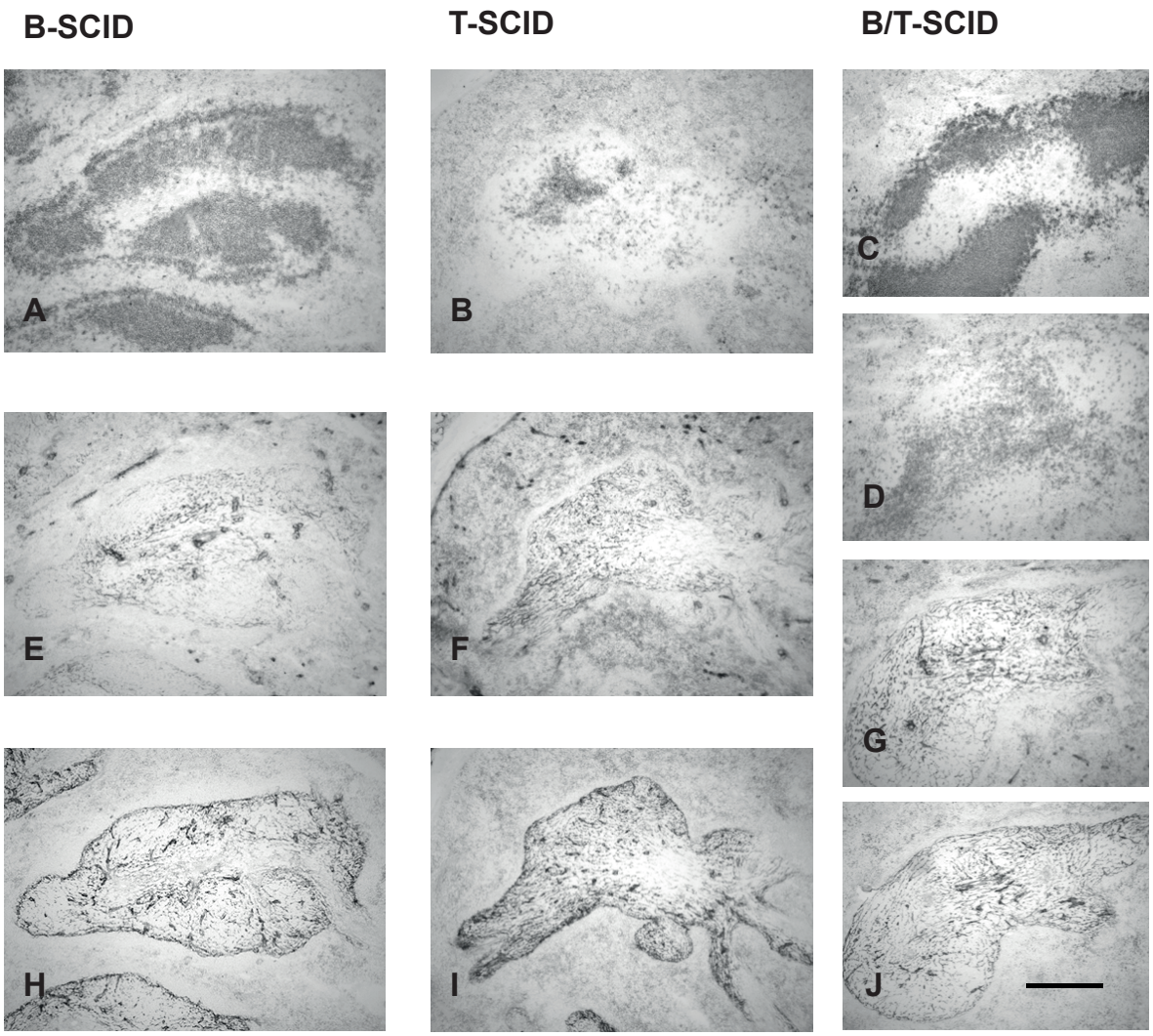
Újszülött (nb, 12 óránál fiatalabb, **A**) 3 napos (D3; **B**), 5 napos (D5; **C**, **D**) és 7 napos (D7; **E**, **F**) lépminták. Az aceton-fixált fagyasztott sorozatmetszetek festődése IBL-10 (**A**, **B**, **C**, **E**, **G**), IBL-11 (**D**, F, **H**), anti-CD45RA/B220 (**I**) és anti-CD3 (**J**) antitestekkel. Az életkorokat a jobb alsó sorok jelölik, a csillagok a centrális arteriolát mutatják. A **B**, **C**, **E** és **G** képekben a nyílhegyek a vörös pulpa IBL-10-pozitív trabekuláris reaktivitását jelölik. A **D** képen a nyilak az IBL-11 antitesttel halványan jelölődő sejtek korai megjelenésére mutatnak. A **J** képben elhelyezett lépték minden képre vonatkozóan 100 μm. *Balogh P, Horváth G, Szakal AK. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. J Histochem Cytochem. 2004 52:1287-98*



6.4. ábra: A γ-sugárzás (A, B) és SCID (C, D) mutáció hatása a fehér pulpa fibroblaszt alcsoportok szerkezetére
Besugárzást követően 48 órával később elvégzett immunhisztokémiai jelölés igazolja az IBL-10 (**A**) és IBL-11-pozitív (**B**) fibroblaszt-alcsoportok rezisztenciáját a besugárzásra, ugyanakkor SCID egerekben az IBL-10 marker (**C**) a vörös pulpa (Rp) területében a trabekuláris reaktivitás (nyíl) mellett a fehér pulpában csak kis mértékben mutatható ki, míg az IBL-11-pozitív (**D**) alcsoport kötegezett elrendeződésben (nyílhegy) a sorvadt fehér pulpa perifériás régiójában halmozódik fel. A csillagok a centrális arteriolát jelölik, a lépték 100 μm. *Balogh P, Horváth G, Szakal AK. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. J Histochem Cytochem. 2004 52:1287-98.*

egerekben a centrális fehér pulpa eltérő IBL-10 és IBL-11 retikuláris reaktivitása a normál mintázatnak megfelelően helyreállt, ugyanakkor a T/B határterületre jellemző erőteljesebb zonális IBL-10 festődés a T-sejt transzferált SCID egerekből hiányzott (**6.5. ábra**).

A fenti eredmények alapján feltételezhető, hogy a lép kötőszövetes vázrendszerének celluláris és ECM összetevői nem fednek át a nyirokszövetek T/B-sejtes zónákra való szegregálódásával (Balogh és mtsai, 2008). Így az IBL-10 marker fokozott expressziót mutatott a T/B határterületben elhelyezkedő alcsoporttal, míg az IBL-11 marker a T-sejt zóna preferencia mellett a főként B-sejteket tartalmazó marginális zónában mutatott intenzív festődést. Ezen megfigyelés felveti a stromális alapállomány eddig ismertnél nagyobb mértékű heterogenitását és/vagy plaszticitását mind nyugvó, mind csíracentrumot tartalmazó nyirokszövet esetében, amit az utóbbi időben elvégzett *Cxcl12*^{GFP} riporter egérvizsgálatok révén a csíracentrumok sötét zónájában elhelyezkedő CRC (CXCL12^{+} reticular cells), valamint a nyirokcsomó T-sejt zónában

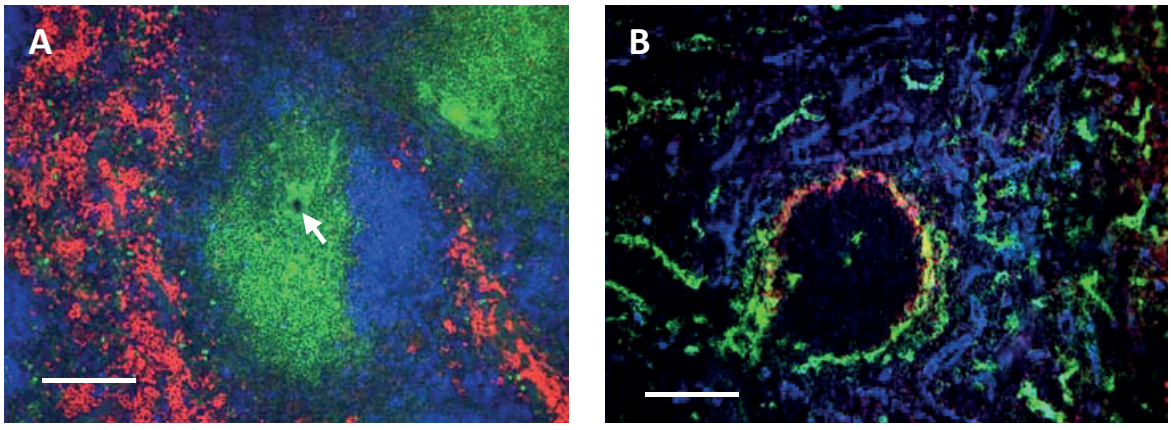


6.5. ábra: SCID egér lép fibroblaszt-kompartmentjeinek helyreállítása eltérő típusú limfocitákkal
A képek feletti megjelölés szerinti donor limfocitákkal elvégzett rekonstrukció során a SCID lép fibroblaszt-alcsoportjainak a normál lépre jellemző mintázat szerinti átrendeződését figyelhetjük meg (**A**, **C**). B220 jelölés (**D**, **E**), CD3 expresszió (**B**, **D**), (**E**-**G**) IBL-10, illetve (**H**-**J**) IBL-11 festés indirekt immunhisztokémiai eljárással. Lépték = 100 µm. *Balogh P, Horváth G, Szakal AK. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. J Histochem Cytochem. 2004 52:1287-98.*

megjelenő VSC (CXCL13-termelő versatile stromal cells) alcsoportok azonosítása is alátámaszt (Mionnet és mtsai, 2013; Rodda és mtsai, 2015).

6.3. Az egér lép vaszkuláris elemeinek szerkezeti elkülönülése és fejlődéstani jellemzőik

A lép összetett limforetikuláris szerveződése miatt mind emberben, mind rágcsálókban a legkevésbé ismert érszerkezettel bíró perifériás nyirokszövet. A nyirokcsomók és a Peyer-plakkok viszonylag részletesen feltárt vér- és nyirokkeringési útvonalaival ellentétben a lép nagymértékben különböző vörös és fehér pulpa állománya, ezek eltérő szerkezeti és funkcionális jellemzői, valamint a lép méretét messze meghaladó arányú vérmennyiség átáramlása és immunológiai szűrése specializált érpályát tesz szükségessé. Az érpálya-hálózat legdúsabb részlete a vörös pulpában található, míg a fehér pulpa felé vándorló limfociták a marginális zóna (MZ) területében (fajtól függően a feltétezhetően eltérő típusú érszakaszokat bélelő endotél felismerését követően) hagyják el az érpályát (Balogh és Lábadi, 2011). A fehér pulpa a legkevésbé vaszkularizált rész, amelyben arteriola típusú érszakaszok helyezkednek el. Ennek megfelelően a limfocita vándorlás szempontjából fontos érszakaszok a lép MZ részében és vörös pulpájában találhatók, melyek pontos topográfiájára igen kevés ismerettel rendelkezünk. Ugyanakkor a lép főbb nyirokszöveti egységei (fehér pulpa, MZ és vörös pulpa) jellegzetesen eltérő típusú érképletek környezetében alakulnak ki, ami ezen ereknek a nyirokszöveti kompartmentalizációban betöltött szerepére utal. Ezen ismeretek bővítésére az egér lép ér-alcsoportjával reagáló antitestek előállítását tűztük ki célul.



6.6. ábra: Az egér lép hematopoetikus és endotél-kompartmentalizációja
Az **A** ábrán (AMCA/kék fluorofórral jelölt; anti-B220) B-sejtek és a T-sejtek (FITC/zöld; anti-Thy-1.2) főként a centrális arteriola (nyíl) körül elrendeződő fehér pulpában halmozódnak, míg a vörös pulpa jelentékeny részét az F4/80 markert (Alexa Fluor 568/vörös) hordozó makrofágok töltik ki. A **B** ábrán az endotél alcsoportok regionális elkülönülése látható, ahol a fehér pulpában elszórtan IBL-7/1 (zöld) pozitív terminális arteriolák találhatók, a centrális arteriola nem festődik. A fehér pulpa szegélye mentén elhelyezkedő marginális szinusz keverten tartalmaz IBL-7/1 és MAdCAM-1 (vörös) markert hordozó endotél sejteket, míg a vörös pulpa főként IBL-9/2 antitesttel (kék) festődő szinuszoidokat tartalmaz, a kevesebb komplementer IBL-7/1-pozitív érszakaszok mellett (lépték 100μm). *Balogh P. és mtsai: Ontogeny and postnatal development of the splenic vascular beds: regional cues, phenotypic responses. In: Embryonic Stem Cell Research - Laboratory and Clinical Research (edited by Greer, Erik V), Stem Cells 2006, 143-169, Nova Sciences Inc.*

IV. táblázat

Szöveti kompartment/értípus	Marker reaktivitás		
	IBL-7/1	IBL-9/2	IBL-20
Centrális arteriola	-	-	+
Fehér pulpa terminális arteriola	++	-	+
Marginális szinusz	++	-	+
Vörös pulpa szinusz I, venulák	+/-	++	+
Vörös pulpa szinusz II	++	-	+

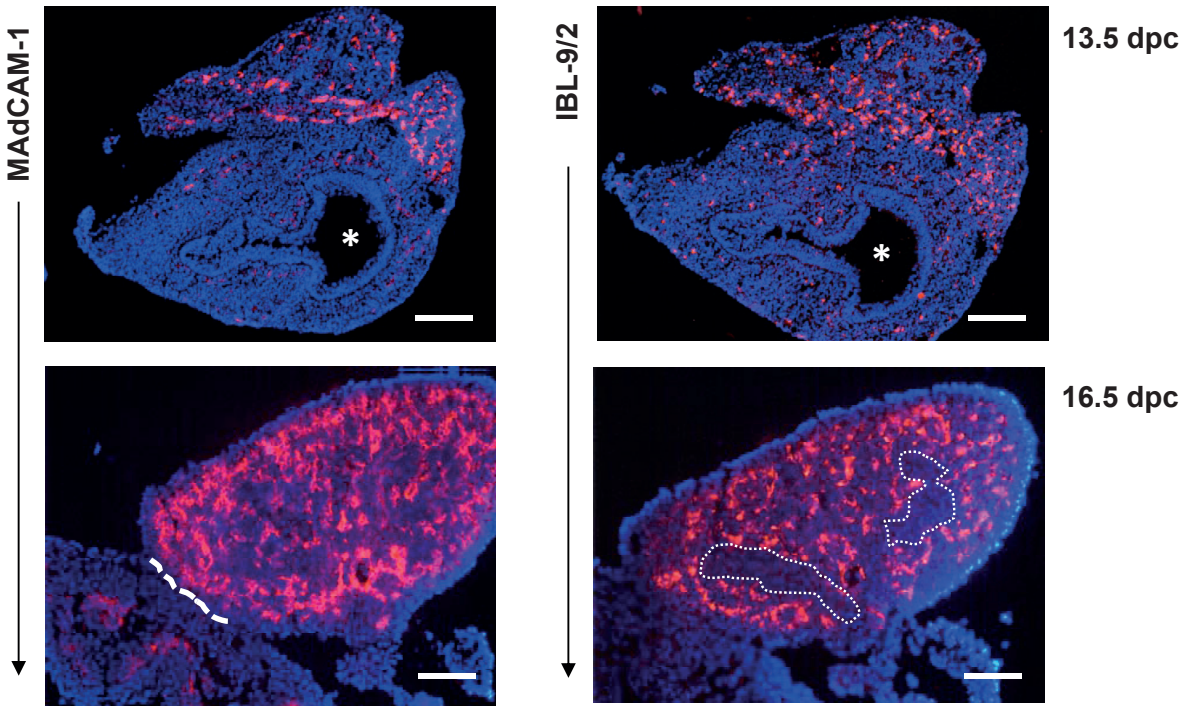
6.3.1. A lép érhálózatának endotél-altípusai sejtfelszíni fenotípusuk alapján

Munkánk során az egér lép ér-összetevőivel szemben három különböző reaktivitású monoklonális antitestet állítottunk elő, amiben az endotél-sejteket VE-kadherin (CD144) kifejeződésük alapján azonosítottuk. Ezek közül a korábban kifejlesztett IBL-7/1 antitest a fehér pulpa terminális arterioláival és a marginális szinusz, valamint a vörös pulpa endotél-sejtjeinek egy részével reagált, míg az IBL-9/2 antitest a vörös pulpa szinuszok többségében előforduló endotél-sejtekhez kötődik. Az IBL-7/1 marker a vörös pulpában egy kisebb számú, de intenzíven jelölődő (IBL-7/1^{hi}), és egy gyengébben festődő (IBL-7/1^{lo}) ér-szegmentumot fedő endotél-alcsoportot ismer fel. Az IBL-7/1 és IBL-9/2 antitest együttes alkalmazásával megállapítottuk, hogy a vörös pulpán belül nagyobb számban kimutatható érképletek IBL-7/1^{lo}/IBL-9/2^{+}, a ritkábban előforduló ér-összetevők IBL-7/1^{hi}/IBL-9/2^{-} fenotípusúak (Balázs és mtsai, 2001; Balogh és mtsai, 2006; **6.6. ábra**). A később előállított IBL-20 antitestet pan-endotél markerként azonosítottuk, amely mind a vérér, mind a nyirokér-endotél sejtekhez kötődik (Kellermayer és mtsai, 2019).

A fenti topográfiai jellemzők alapján a lép egyes területeiben kimutatható endotél-sejtek a **IV. táblázatban** feltüntetett marker-megoszlást mutatják. Eredményeink alapján a legszelektívebb marker a vörös pulpára lokalizálódó IBL-9/2. Az IBL-7/1 kiterjedtebb szöveti reaktivitást mutat, míg az IBL-20 marker mindhárom régió ereit bélelő endotélhez kötődik. Az IBL-7/1 marker intenzív jelölődést mutat a marginális szinusz endotél-sejtjeivel, amelyeken a MAdCAM-1 addresszin is kifejeződik. Fontos ugyanakkor megemlíteni, hogy a MAdCAM-1 marker a marginális zónában elhelyezkedő MRC-n is kifejeződhet, illetve T-dependens antigénekkel szembeni csíracentrum-reakcióval járó immunválaszban a szekunder nyiroktüsző follikuláris dendritikus sejtjein (a VCAM-1 glikoproteinnel együtt) is megjelenik, utalva a stromális összetevők egyértelmű immunhisztokémiai azonosításának nehézségére (Balogh és mtsai, 2002).

6.3.2. A lép érhálózatának differenciálódása és kompartmentalizációja

Munkánk következő szakaszában az egyes regionális endotél-alcsoportok fejlődéstani jellemzőit vizsgáltuk. Az egér lép fejlődése során a lép előtelepben a gyomorról történő leválását (12,5-13,5 embrionális nap) követően a fejlődő lép-ereken a MAdCAM-1 és IBL-9/2 markerek mutathatók ki, territoriális specializáció nélkül. A 16,5-18,5. embrionális napok közötti időszakban a MAdCAM-1-pozitív sejtek fokozott csoportosulása (Vondenhoff és mtsai, 2008),



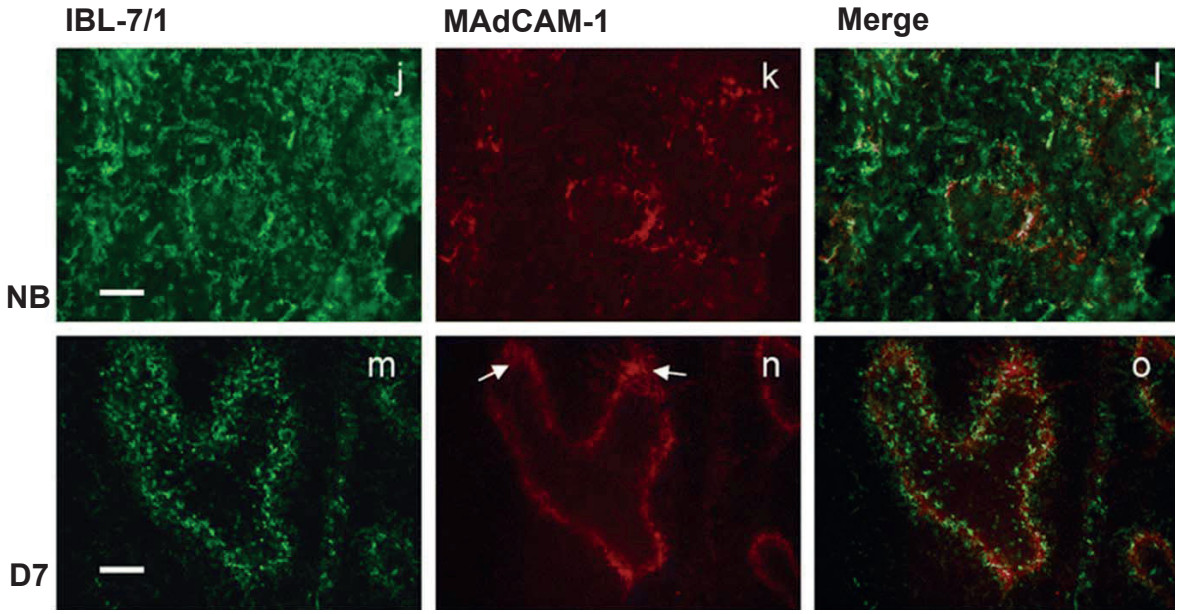
6.7. ábra: Az egér lép embrionális ér-mintázata

A 13,5. és 16,5. embrionális napon (a 0,5. napon észlelt hüvely-dugóhoz/dpc viszonyítva) vett minták jelölés szerinti antitestekkel elvégzett immunfluoreszcens (vörös) festése DAPI magfestés mellett (*, gyomor ürege). A bal alsó képen lévő szaggatott vonal a gyomor és a lép határát jelzi. A pontozott vonallal kijelölt területek a jobb alsó képen a fehér pulpa előtelep határát jelzik, a körülötte lévő vörös pulpa előtelepet gazdagon átszövik IBL-9/2$^+$/MAdCAM-1$^+$ erek, a MAdCAM-1$^+$ marginális szinusz még nem alakult ki (lépték: 50 μm). *Kellermayer Z, Hayasaka H, Kajtár B, Simon D, Robles EF, Martinez-Climent JA, Balogh P. Divergence of Vascular Specification in Visceral Lymphoid Organs-Genetic Determinants and Differentiation Checkpoints. Int Rev Immunol. 2016 35:489-502.*

valamint az IBL-9/2 inhomogén jelölése (**6.7. ábra**) a vörös-fehér pulpa elkülönülését jelzi (Kellermayer és mtsai, 2016).

Újszülött egérben (12 óránál/fél napnál fiatalabb) a két alcsoport-specifikus antitesttel (IBL-7/1 és IBL-9/2) festődő vaszkuláris képletek (marginális szinusz és különböző vörös pulpa szinusz alcsoportok) kimutathatóak voltak, ugyanakkor szöveti elrendeződésük nagymértékben különbözött a felnőtt mintázattól. A lép festődési mintázata ebben a korai szakaszban kezdetlegesen szerveződött érhálózatot mutatott. Ebben az időszakban az IBL-7/1 reaktivitás a fejlődő fehér pulpa perifériás részében elhelyezkedő, számos esetben elágazó nyúlványos szerkezetű, elongált sejtekre korlátozódott. Az IBL-9/2-pozitív elemek diffúzan elhelyezkedő, változó megjelenésű sejtekként mutatkoztak, hálózat-képződésre utaló jellemzők nélkül.

1 hetes korra a lép fehér pulpa retikuláris szerveződése, valamint a vörös pulpa és fehér pulpa specializált érelemeinek szegregálódása jelentékeny mértékben előrehaladt. A marginális szinusz MAdCAM-1 markert kifejező komponensei egymással összekapcsolódott gyűrűt mutattak. Ugyanakkor az IBL-7/1-pozitív sejtek közötti rések alapján ez még nem jelentett teljes ér-folytonosságot. A vörös pulpában az IBL-9/2-pozitív elnyújtott sejtek összekapcsolódása egy hálózat-szerű elrendeződést mutatott.



6.8. ábra: Az egér lép korai posztnatális érpálya-módosulása
Az újszülött (NB) és egy hetes (D7) lép-minták IBL-7/1 (zöld) és anti-MAdCAM-1 (vörös) antitestekkel elvégzett immunfluoreszcens festése és kombinálása (l/o). Újszülöttben az IBL-7/1 (**j**) mintázat alapján a vörös és fehér pulpa nem megkülönböztethető, a MAdCAM-1 (**k**) jelölődés foltszerűen különálló csoportokat azonosít, amelyben a jelölt sejtek nem képeznek folyamatos határréteget. Egy hetes korra az IBL-7/1-pozitív sejtek (**m**) lazán csoportosulnak a fehér/vörös pulpa határon, a MAdCAM-1 pozitív sejtek (**n**) többnyire folytonos határréteget alkotnak fokális expanzióra utaló kiszélesedéssel (nyilak) (reprezentatív kép, *n*=3, lépték: 50 μm). *Balázs M, Horváth G, Grama L, Balogh P. Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. Cell Immunol. 2001 212:126-37*

3 hetes korra kialakult a felnőttre jellemző ér-mintázat. A marginális szinusz egy folytonos érképletnek tűnt, ami a fehér pulpa belső részét elválasztja a marginális zónától. Az IBL-9/2-pozitív vörös pulpa erek gyakori elágazásokat tartalmazó kiterjedt hálózatot képeznek a marginális zónán kívül, ami megfelelt a felnőttkori jellemzőknek (Balázs és mtsai, 2001). A MZ korai posztnatális fejlődési állapotait a **6.8. ábra** illusztrálja.

Az életkorral változó hematopoetikus és immunológiai jelentősége mellett a lép a vasforgalomban is központi szerepet játszik, és ennek megfelelően érpálya-képződését ezen utóbbi anyagcsere-hatások is befolyásolják. Megfigyelésünk szerint az embrionális/korai posztnatális életre jellemző vérképzés megszűnésével párhuzamosan a fokozott ferroportin kifejeződéssel járó polycythemia (*Pcm*) mutáció a vörös pulpában elhelyezkedő IBL-9/2-pozitív erek drasztikus csökkenését okozza (Mok és mtsai, 2004). Ennek a jelenségnek a pontos celluláris összetevői (vörös pulpa makrofágok vagy az itt elhelyezkedő nem-hematopoetikus kötőszövet) és mechanizmusai jelenleg ismeretlenek. Szintén a lép vöröspulpa érpálya-összetevőinek egyéb anyagcsere- és transzportfolyamataira utalhat a kémiailag módosított albumin szelektív kötődése (Balogh és Petz, 2005) az IBL-9/2-pozitív endotél sejtekhez. További metabolikus jelentősége lehet ugyanezen szinusz-endotél sejteken a stabilin-2/Stab2 kifejeződésének is, amely a hialuronsav és potenciális glikációs végtermékek megkötése mellett a von Willebrand faktor-VIII. faktor komplex plazma féléletidejének meghatározásában (Swystun és mtsai, 2018) is fontos szerepet tölt be.

6.4. A lép follikuláris dendritikus sejtjeinek érése és öregedéssel kapcsolatos funkcionális károsodása

6.4.1. Az FDC fenotípus és funkció főbb jellemzői egér lépben

A follikuláris dendritikus sejtek (FDC) a perifériás nyirokszövetek nyiroktüszőiben a nem-hematopoetikus stromális elemek túlnyomó részét alkotják (Tew és mtsai, 1990). CXCL13 kemokin termelésük révén fontos pre-immun funkcióik közé tartozik a B-sejtek és follikuláris T helper (T_{FH}) sejtek toborzása a nyiroktüszőbe, melyek jelenlétükkel elősegítik az FDC-előalakok érését (Ansel és mtsai, 2000). A BcR-en keresztül T-dependens antigének által kiváltott B-sejt stimulációt, és a szolúbilis antitest-képződést követően az FDC hálózat az antigén immunkomplex formájában történő megkötésével és tartós fenntartásával elősegíti a csíracentrumok kialakulását (Hanna és Szakal, 1968; Schriever és Nadler, 1992). Az immunkomplex megkötésében számos sejtfelszíni receptor vesz részt, amik közé tartoznak a komplement receptorok (CR1.2 [CD21/35]) és II. típusú Fcγ receptorok (CD16/32) (Van den Berg és mtsai, 1995). Megkötésüket követően az immunkomplexek tartósan az FDC felszínéhez kapcsolódva maradnak, és fontos szerepet töltenek be a csíracentrum B-sejtek klonális expanziójában és affinitás-érésében (Qi és mtsai, 2014; Bannard és Cyster, 2017).

A lépet, mint fontos perifériás nyirokszövetet számos alkalommal vizsgálták a TNF/LT ligand–receptor interakciók nyirokszöveti fejlődésbiológiai és immunológiai szerepének meghatározására irányuló kutatásokban. Ezekben a munkákban tipikusan fiatal felnőtt egerek lépét vizsgálták, ugyanakkor az FDC mint fontos strukturális szervező és immunválasz/csíracentrum reakcióban részt vevő stromális összetevő érettségi állapota nem volt ismert. Az FDC érésére irányuló korábbi, viszonylag kevés számú vizsgálat során nem merült fel az FDC-prekurzorok immunkomplex-kötő kapacitásának elemzése. A következő munkánkban az újszülött lép FDC-előalakjainak érését és HRP anti-HRP immunkomplex megkötésükön keresztül felnőtt típusú funkcionális elköteleződését vizsgáltuk normál és irradiált újszülött egerekben (Balogh és mtsai, 2001). Ezt követően az érett FDC csíracentrum-reakció során megfigyelt fenotípus-változását tanulmányoztuk (Balogh és mtsai, 2001). Mivel az időskorra jellemzően az immunrendszer T-dependens antigénekkel szembeni memória típusú immunválasz-készsége károsodik, megvizsgáltuk az ennek hátterében lévő FDC-t érintő eltéréseket is (Aydar és mtsai, 2002; Aydar és mtsai, 2003).

6.4.2. FDC-markereket hordozó sejtek megjelenése és megoszlása

Először az FDC-markereket hordozó sejtek időbeni megjelenését és újszülött lépen belüli megoszlását vizsgáltuk az FDC-M1 (milk fat globule epidermal growth factor 8/Mfge8; Kranich és mtsai, 2008) és FDC-M2 (C4 komplement faktor; Taylor és mtsai, 2002) markerek megjelenésével, amit *in situ* immunkomplex-megkötésével korreláltunk. Az immunhisztokémiai eredmények szerint az FDC-M1 marker először 3,5 napos korban jelent meg, a túlnyomórészt

V. táblázat

Életkor	Marker	Expresszió/Lokalizáció
P3	FDC-M1	A fehér pulpa körüli diffúz gyűrű
P5	FDC-M1	A fehér pulpa körül elhelyezkedő egyedi sejtek
P7	FDC-M1	A fehér pulpa szélén elhelyezkedő gyűrű, a fehér pulpában kisebb sejtcsoportok
	CR1.2	Kisebb sejtcsoportok a fehér pulpán belül
P10	CR1.2	Nagyobb számú follikuláris expresszió
	FDC-M2	Néhány CR1.2 pozitív sejthez kapcsolódóan a follikuluson belül és perivaszkuláris köteges reaktivitás
P14	FDC-M2	Fokozódó intenzitású follikuláris reaktivitás
	CD16/32	Elszórt follikuláris reaktivitás

B-sejtekből álló, periarterioláris elhelyezkedésű fejlődő fehér pulpa perifériás részén. Az 5. napra az FDC-M1 festődés kifejezettebbé vált, ugyanakkor más FDC-marekerek nem voltak kimutathatóak. A 7. napon az FDC-M1-pozitív sejtek kisebb csoportokba rendeződtek, és rajtuk a CR1.2 komplement receptorok (CD21/35) is megjelentek.

A 10. napra az érettebb szerkezetű nyiroktüszőkön belül elszórtan FDC-M2 festődést tapasztaltunk a CR1.2 expresszió intenzitásának fokozódásával együtt. A 14. napra létrejött a felnőtt típusú elrendeződés, aminek részeként néhány follikulusban FcγRII/III (CD16/32)-pozitív FDC-t figyeltünk meg. Az FDC-markereket hordozó sejtek megjelenését és megoszlását az **V. táblázat** mutatja. Az általunk leírt FDC érési mintázat-váltást (Balogh és mtsai, 2001) megerősítve későbbi vizsgálatok kimutatták a lép FDC hálózat FDC-M1/Mfge8$^+$ perivaszkuláris PDGFR$^+$ sejtekből történő differenciálódását (Krautler és mtsai, 2012).

Az FDC markerek megjelenésén túlmenően az FDC-M1/komplement receptor-pozitív sejtek funkcionális elkötelezettségét az immunkomplex tartós megkötésén keresztül vizsgáltuk. Ennek során a 7. napon elvégzett anti-HRP antitesttel történő passzív immunizálást követően HRP beoltása után 1 héttel az állatokat perfundáltuk, majd az immunkomplexek retencióját annak HRP-aktivitásán keresztül detektáltuk. A szövettanilag kimutatott CR1.2 megoszlásához nagymértékben hasonló rajzolatú immunkomplex-kötő hálózatot észleltünk a fehér pulpában, ami ezen FDC-markereket hordozó sejtek funkcionális aktivitását igazolta.

6.4.3. Az FDC előalakok γ-irradiáció-rezisztens érése

Korábbi, érett FDC tanulmányozása során nyert adatok szerint ezen sejtek γ-sugárzással szembeni rezisztenciája meghaladja a letális dózist (Qin és mtsai, 2000). Az FDC-érés során észlelt marker-expressziós sorrend besugárzással szembeni érzékenységének meghatározására háromnapos korban (a fenti eredmények alapján az FDC-M1$^+$/CR1.2$^-$/FDC-M2$^-$ állapotban) elvégzett 7,5 Gy dózisú besugárzást követően a 10. napon vizsgáltuk a lépet (Balogh és mtsai, 2001). Az irradiálás a B-sejt készlet nagymértékű vesztéséhez vezetett, ami a B220-pozitív terület 90%-ot meghaladó csökkenésében mutatkozott. A nagyfokú B-sejt depléció ellenére az FDC-M1 és CR1.2 markereket hordozó érett FDC sejtek megjelenése és megoszlása a nem-ir-

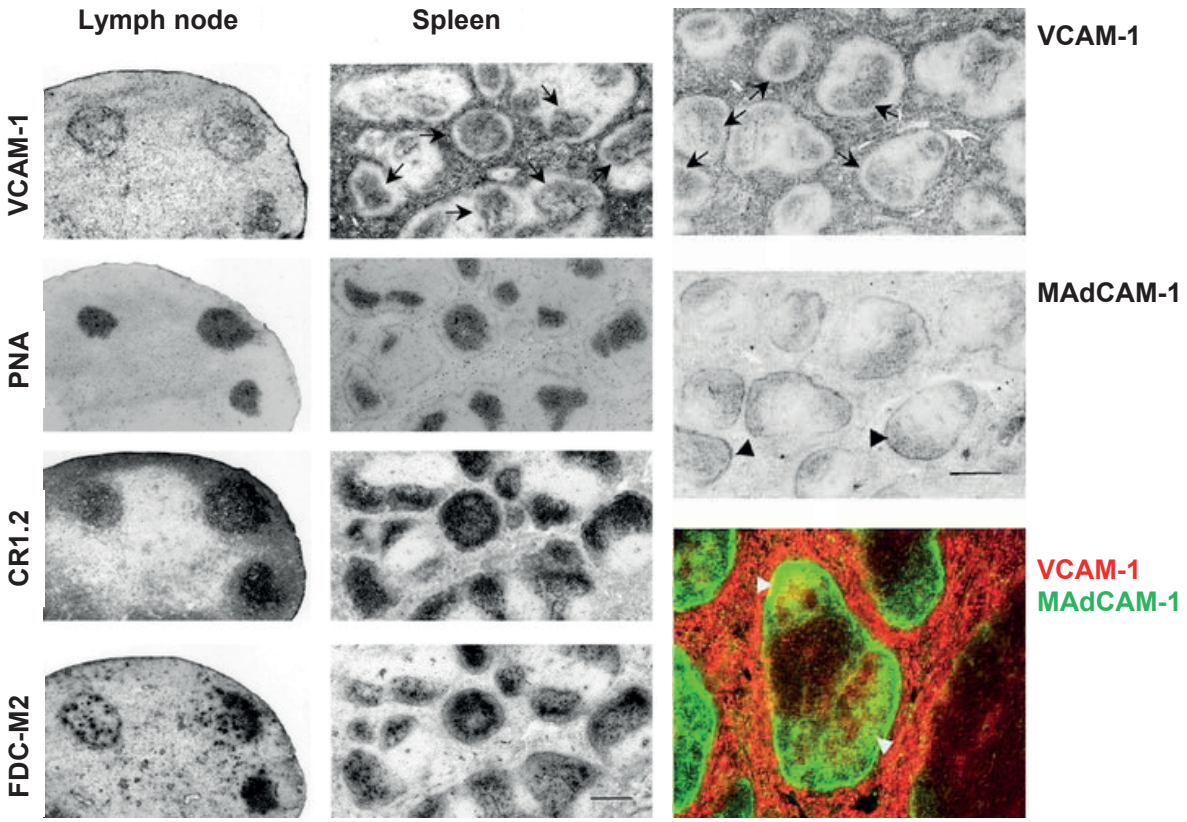
radiált kontrolloknak megfelelő volt. Ezen megfigyelés szerint az FDC-előalakok γ-sugárzással szembeni rezisztenciája mellett az FDC differenciálódás nagymértékben csökkent denzitású, és túlnyomóan éretlen B-sejt környezetben (Loder és mtsai, 1999) is végbemegy.

6.4.4. Az FDC fenotípus változása csíracentrum reakció során

Az FDC-nek a primer és szekunder follikulusok közötti eltérő sejtes összetételhez és megváltozott szöveti elrendeződéshez való adaptációját az FDC csíracentrum-fejlődéséhez kapcsolható fenotípus-változásain keresztül vizsgáltam (Balogh és mtsai, 2002). T-dependens antigénekkel történő immunizálás nélkül csak elszórtan észleltem a VCAM-1 adhéziós molekula kifejeződését a follikulusok területén akár a lépben, akár nyirokcsomókban, ugyanakkor a lép PALS és vörös pulpa állománya nagy mennyiségben tartalmazott stromális (extravaszkuláris) VCAM-1-pozitív sejteket. A PALS-ban ezen sejtek a korábbi leírásoknak megfelelően (Gao és mtsai, 1997) elongált és gyakran elágazó nyúlványos szerkezetet mutattak. A marginális szinusz csak mérsékelt intenzitású VCAM-1 festődést mutatott. A különböző vörös pulpa összetevők, elsősorban a makrofágok (Sadahira és mtsai, 1995) és trabekuláris stromális sejtek (Castro és mtsai, 1997) intenzíven jelölődtek az anti-VCAM-1 antitesttel. A stimulálatlan léppel szemben az alimentáris és más külső antigéneknek folyamatosan kitett PP ugyanakkor számos csíracentrumot tartalmaz, amikben az FDC-M2-pozitív FDC retikulum elrendeződésének megfelelő szöveti megoszlású kiterjedt VCAM-1-pozitív hálózatot észleltünk.

A VCAM-1 hiánya a lép primer follikulusokban és jelenléte a PP csíracentrum FDC-n felvetette az immunizálás jelentőségét, aminek vizsgálatához birka vörösvértesttel (SRBC), mint T-dependens antigénnel intraperitoneálisan immunizáltunk fiatal felnőtt egereket. Oltás után különböző időpontokban a csíracentrum kialakulásával korrelálva vizsgáltuk a VCAM-1 megjelenését, amit a csíracentrumokat jelölő földimogyoró (PNA) lektin hisztokémiával korrelálva elemeztünk. Az immunizálást követő 5-7. napon kezdődő PNA-pozitív csoportosulás follikuláris megjelenésével párhuzamosan a lépben a CR1.2 és FDC-M1 lokalizációnak megfelelően intenzíven VCAM-1-pozitív hálózat alakult ki.

A VCAM-1 indukcióval párhuzamosan az immunizált állatok lépében a csíracentrumot tartalmazó szekunder follikulusokban a MAdCAM-1 antigén is megjelent. Nyugvó lépben a MAdCAM-1 a marginális szinuszt bélelő sejtek felszínén jelenik meg (Kraal és mtsai, 1995), bár ott betöltött funkciója jelenleg ismeretlen. Ez a follikuláris MAdCAM-1 expresszió a marginális színusszal folyamatosan haladt a nyiroktüsző mélyebb részletei felé, míg a csíracentrumban elhelyezkedő VCAM-1-pozitív csoportosulást egy 30–50-µm vastagságú VCAM-1 negatív gyűrű veszi körül, így az elkülönült a marginális szinusztól. A metszetek MAdCAM-1/VCAM-1 kettős festése igazolta a nyiroktüsző perifériás részén lévő MAdCAM-1^{+}/VCAM-1^{-} komponens jelenlétét, amely a MAdCAM-1/VCAM-1 kettősen pozitív összetevő körül helyezkedik el. A VCAM-1 és MAdCAM-1 megjelenése hasonló időbeli kinetikát mutatott, ami az immunizálás utáni 5. napon kezdődött és a 7. napra teljesedett ki. Ezen megfigyelések szerint a sejtvonal-függő FDC-M1 és CR1.2 folyamatos kifejeződésével szemben a VCAM-1 és MAdCAM-1 megjelenése immunizálástól függ, és jelenlétük az FDC aktivációját jelzi. Ez az átalakulás az



6.9. ábra: Az egér lép csíracentrum FDC kompartmentalizációja
A nyirokcsomó (bal oldali oszlop és a lép (középső oszlop) csíracentrum-asszociált FDC marker-expressziója a jelzett markerekkel reprezentatív képeken (*n*=5). A lép VCAM-1 mintájában a nyilak az alatta lévő képben bemutatott azonos PNA-pozitív csíracentrumokat jelölik (lépték: 200 μm). A jobb oldali oszlopban az anti-VCAM-1 és anti-MAdCAM-1 sorozatmetszeteken az azonos csíracentrumokon belüli VCAM-1 negatív (nyíl) és MAdCAM-1 pozitív (nyílhegy) régiók láthatók, a legalsó képen a feltüntetett immunfluoreszcens jelöléssel a MAdCAM-1^{+}/VCAM-1^{-} szegmens látható (nyílhegy) (reprezentatív kép, *n*=3, lépték: 200 μm). *Balogh P, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK. Appearance and phenotype of murine follicular dendritic cells expressing VCAM-1. Anat Rec. 2002 268:160-8.*

SRBC-vel való immunizálás után legalább 4 hétig fennmarad, és a PNA-pozitív csíracentrumra korlátozódik (**6.9. ábra**). A két adhéziós molekula megjelenésének időpontjában és perzisztenciájában nem találtunk különbséget a fiatal és idős (>20 hónap) egerek között. Így az idős állatok károsodott csíracentrum-képző képessége (Szakal és mtsai, 1990) független ezen molekulák FDC általi fokozott kifejeződésétől (Balogh és mtsai, 2002).

6.4.5. Öregedéshez kapcsolt hanyatlás: Az FDC-k csökkent CD21L retenciója és csökkent FcγRII/RIII expressziója az FDC-t nem-stimulátor partnerré alakítja a csíracentrum reakcióban

Humán és egér megfigyelések alapján ismert, hogy idős egyedekben az immunrendszer képessége a patogének kiiktatására jelentősen korlátozott, ami az immunológiai öregedés koncepcióját vetette fel (Nikolic-Zugic, 2018). Bár számos megfigyelés számolt be a nyirokszövetek hematopoetikus összetevőit érintő eltérésekről, hasonlóan részletes adatok a stromális mikrokörnyezet immunológiai állapotáról nem állnak rendelkezésre, elsősorban a specifikus

reagensek hiánya, az *in vitro* nehezen meghatározható funkcionális paraméterek és a hatékony sejt-tisztítási eljárások hiánya miatt.

A T-dependens humorális immunválaszokat elősegítő limfoid stromális összetevők közül az FDC a legkiterjedtebben vizsgált sejtcsoport. Az FDC jelentősége a csíraközpont reakcióban elsősorban a komplement-fragmentumokkal fedett immunkomplexek (iccosoma) bemutatása révén a B-sejtek stimulálása a BcR és CR1.2 egyidejű ligand-kötése által. A stimulátor hatást tovább fokozza, hogy az IgG-tartalmú, így elsődlegesen az ITIM-tartalmú CD16/32 (FcγRIIB) által megköthető immunkomplexek inkább az azt sokszorosan nagyobb mennyiségben kifejező FDC, mint a B-sejtek számára jelentenek ligandot. Ennek megfelelően az egyik lehetséges út a stimulátor hatás kiváltására az immunkomplexek olyan módú megkötése a B-sejteken, hogy abban a BcR-CR1.2 kapcsolódás mértéke meghaladja a BcR-FcγRIIB-közvetítette ligandkötés mértékét. Ennek elmaradása lehetővé teszi a BcR-FcγRIIB kapcsolódást, ezáltal gátolva a B-sejteket (Aydar és mtsai, 2004).

Korábbi tanulmányok jelentősen csökkent csíracentrum-képződést és az FDC-k alacsony hatékonyságú immunkomplex-retencióját igazolták idős (>20 hónap) egerekben (Szakal és mtsai, 1990), aminek további részleteinek feltárására *in vitro* ko-kultúra kísérletekben vizsgáltuk az idős T-sejtek, B-sejtek és FDC-k szerepét a gátolt T-dependens immunválaszokban. Munkánk során fiatal T és/vagy B-sejtek idős FDC-kel való inkubációja során jelentékenyen csökkent antitest-termelést tapasztaltunk, amit komplement hozzáadása mérsékelten javított, míg fiatal FDC jelenlétében az idős T/B-sejtek a normálnak megfelelő antitest-termelést tudtak fenntartani. Immunhisztokémiai eredményeink szerint a megfelelő intenzitású CR1.2 jelenléte ellenére az idős FDC-re a csökkent FDC-M2 reaktivitás jellemző, ami a komplement C4-nek az FDC-k általi alacsonyabb szintű megkötését jelzi. Ugyanakkor az idős FDC-ken elmaradt az FcγRIIB expressziójának fokozódása, ami által az FDC-k IgG-tartalmú immunkomplexek megkötésének a B-sejtek analóg receptoraival szembeni kompetíciós előnye elveszett, így a B-sejtekben a FcγRIIB-hoz kapcsolt SHIP (Src homology 2-domain-containing inositol phosphatase) foszforiláción keresztüli ITIM szignalizáció iniciálódhatott (Aydar és mtsai, 2002; Aydar és mtsai, 2003).

6.5. A lép MZ makrofágok, MZ B-sejtek és FDC szerepe a MARCO scavenger receptor follikuláris conduit-rendszerhez kapcsolt felhalmozódásában

6.5.1. A lép marginális zóna és nyiroktüsző közötti kommunikáció molekuláris és sejtes összetevői

A lép marginális zónája (MZ) a lép egyedi, komplex szerkezetű nyirokszöveti összetevője, ahol a véráramlással bejutott patogénekkel szemben veleszületett és adaptív immunválaszok alakulnak ki. A veleszületett immunválaszok létrehozásában elsősorban a többféle mintázatfelismerő receptorokat hordozó MZ makrofágoknak, míg az adaptív immunválaszokban a specializált MZ B-sejteknek van jelentős szerepe (Mebius és Kraal, 2005; Mebius és Kraal, 2006).

A MZ makrofágok szoros kapcsolatban állnak a MZ B sejtekkel, melyek elsősorban a tokos baktériumok által hordozott antigénekkel reagálnak T-independens módon. Emellett a MZ B-sejtek részt vesznek az oldott antigének felvételében és follikuláris irányú transzportjában is, így hozzájárulva a T-dependens csíraközpont-reakció follikuluson belüli elindításához (Mebius és Kraal, 2006). Itt az FDC-k a migrációs információt nyújtó CXCL13 kemokin-termelésük és adhéziós receptoraik révén elősegítik a B-sejtek és T_{FH} sejtek irányított vándorlását, ami által hozzájárulnak az aktivált B-sejtek expanziójához szükséges mikrokörnyezet kialakításához (Fu és mtsai, 1998; Ansel és mtsai, 2000; Cinamon és mtsai, 2008). Az FDC-k differenciálódása és a MZ összetevőinek elrendeződése egyaránt a B-sejtek posztnatális jelenlététől függ, ami a nyirokszövet szerkezeti érésének elősegítésén keresztül elengedhetetlen a szervezet hatékony humorális válaszkészségének a kialakításához (Kapasi és mtsai, 1993; Fu és mtsai, 1998; Gonzalez és mtsai, 1998; Balogh és mtsai, 2001; Nolte és mtsai, 2004).

Az egér MZ-ban szöveti elhelyezkedésük és sejtfelszíni jellemzőik alapján két fő makrofág alcsoportot különböztetünk meg (Mebius és Kraal, 2005; Mebius és Kraal, 2006). A MAdCAM-1^+ marginális szinusz follikuláris felülete mentén találjuk a szialoadhezin (Sn)/CD169 és CR-MR/CD206 (cysteine-rich domain of mannose receptor) markereket hordozó metallofil makrofágokat, míg a MAdCAM-1^+ marginális szinusz vörös pulpa felőli felülete mentén helyezkednek el a MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) és SIGN-R1/CD209 receptorokat hordozó MZ makrofágok (MZM; Mebius és mtsai, 2004; Martinez-Pomares és Gordon, 2012). A MARCO receptor az A-osztályú scavenger receptorok családjába tartozik, expresszióját TLR4-ligand LPS kezeléssel a vörös pulpa makrofágokon is ki lehet váltani (Elomaa és mtsai, 1995; Kraal és mtsai, 2000).

A MZ és a nyiroktüsző között számos celluláris és molekuláris kapcsolódás segíti elő a humorális immunválaszok kialakulását. A MZ B-sejtek rendszeresen belépnek a nyiroktüszőbe, és ott komplementtel fedett immunkomplexeket juttatnak el az FDC felszínére (Cinamon és mtsai, 2008), amiben a MZ makrofágokon kifejeződő SIGN-R1 révén megkötött C1q elősegíti

a helyi komplement-aktivációt (Kang és mtsai, 2006). Emellett a CR-MR elősegítheti szolúbilis mannozilált antigének bejutását a nyiroktüszőkbe azok FDC felületi megkötésére (Taylor és mtsai, 2005). Így a MZ makrofág-asszociált SIGN-R1 és CR-MR molekulák részt vehetnek a MZ felől a nyiroktüszőbe irányuló antigén-transzportban, és ezen keresztül a B-sejtes mikrokörnyezet veleszületett ligand-mikrokörnyezetének kialakításában. Ugyanakkor a MARCO receptor esetleges MZ-nyiroktüsző közötti kommunikációs szerepéről annak intenzív kifejeződése ellenére sincsenek adatok. Ebben a munkában a MZ makrofágok nyiroktüszői MARCO megoszlását és az abban résztvevő sejtek szerepét vizsgáltuk (Kellermayer és mtsai, 2014).

6.5.2. A nyiroktüsző MARCO-pozitív csatornarendszer szerkezeti jellemzői és az FDC hálózat szerepe a MZ MARCO akkumulálásában

Különböző anti-MARCO monoklonális antitestekkel végzett immunhisztológiai vizsgálatok eredményei szerint az erőteljes MZ-festődés mellett a nyiroktüsző finom retikuláris reaktivitást mutat (Kvell és mtsai, 2006; Birjandi és mtsai, 2011). Munkánkban először megerősítettük, hogy a MARCO a lépre jellemzően a nyiroktüszőben granulált megjelenésű finom retikuláris mintázatban helyezkedik el, ami hiányzik a MZ-t nem tartalmazó nyirokcsomókból. Nagyobb nagyítás alapján a follikuláris MARCO 0,3-0,5 μm átmérőjű elágazó fibrilláris szerkezetű granuláris alegységekből épül fel.

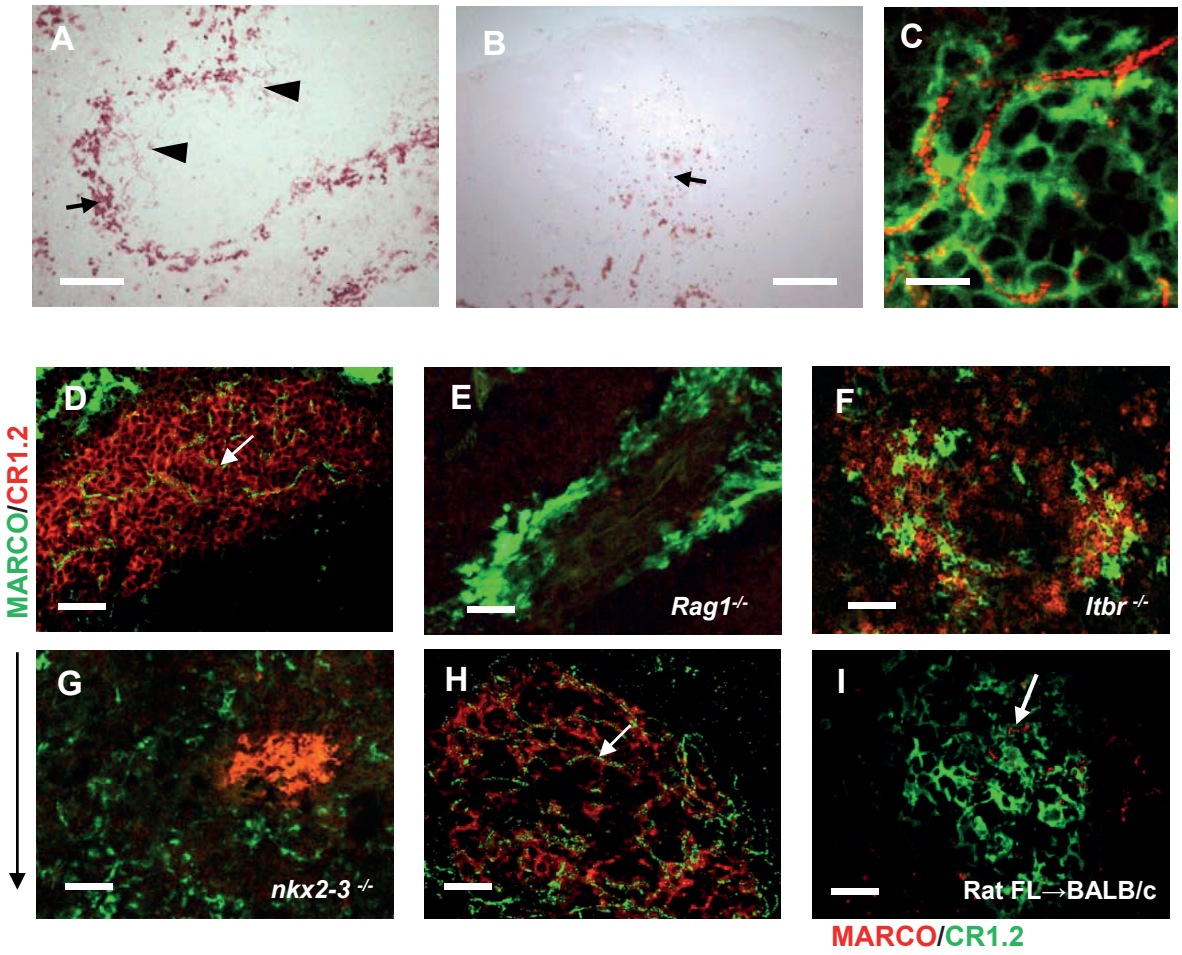
Ez a mintázat felvetette az FDC-ket, mint lehetséges MARCO-t tartalmazó follikuláris stromális sejteket. Kettős fluoreszcens jelölésben a follikuláris MARCO a CR1.2 alapján azonosított FDC felületén fonal-szerű benyomatokban diszkontinuous granulumokba rendeződve helyezkedik el, amit a 3D rekonstrukcióval kapott eredmény is megerősített. Az aktivált C4 komplementtel, mint passzívan kötődő FDC-specifikus liganddal reagáló FDC-M2 antitest jelölési mintázata szintén alátámasztotta a follikuláris MARCO FDC kapcsolódását és conduit-szerű megoszlását (**6.10. ábra**). Morfometriai analízis alapján a follikuláris MARCO hozzávetőleg 60%-a kapcsolódik CR1.2 és FDC-M2 pozitív FDC-hez, ugyanakkor az össz-FDC mintegy 15-20%-a hordoz MARCO-t.

A follikuláris MARCO megjelenésében részt vevő sejtek meghatározására a normál egerek MARCO megoszlását különböző hematopoetikus vagy stromális eltérésekkel rendelkező egerekhez hasonlítottuk, amelyekben a MZ és/vagy a fehér pulpa szerkezete károsodott. T- és B-sejteket nem képző *Rag1*$^{-/-}$ egerek nem képesek FDC kialakítására (Fu és mtsai, 1998). Ezekben az egerekben a robusztus MZ MARCO-jelenlét ellenére a csökevényes fehér pulpában nem volt kimutatható MARCO. Limfotoxin β-receptor-hiányos (*ltbr*$^{-/-}$) egerekben a MZ szerkezeti érése és az FDC differenciálódása gátolt, de van elkülönült fehér és vörös pulpa (Fütterer és mtsai, 1998). A *ltbr*$^{-/-}$ egerekben a MZ lokalizációjú MARCO-pozitív sejtek kisebb csoportokban helyezkedtek el, és nem képeztek folyamatos határréteget, és a fehér pulpában sem volt kimutatható MARCO.

BALB/c egerekben a lép MZ makrofágok klodronát-liposzóma intravénás injekciójával történő depléciója (van Rooijen és van Nieuwmegen, 1984) után a MARCO-pozitív makrofágok 48

órán belül eliminálódtak, ugyanakkor a follikuláris MARCO továbbra is kimutatható volt a depléció utáni 10. napig, amikor a MARCO-pozitív makrofágok újra elkezdték a MZ repopulálását.

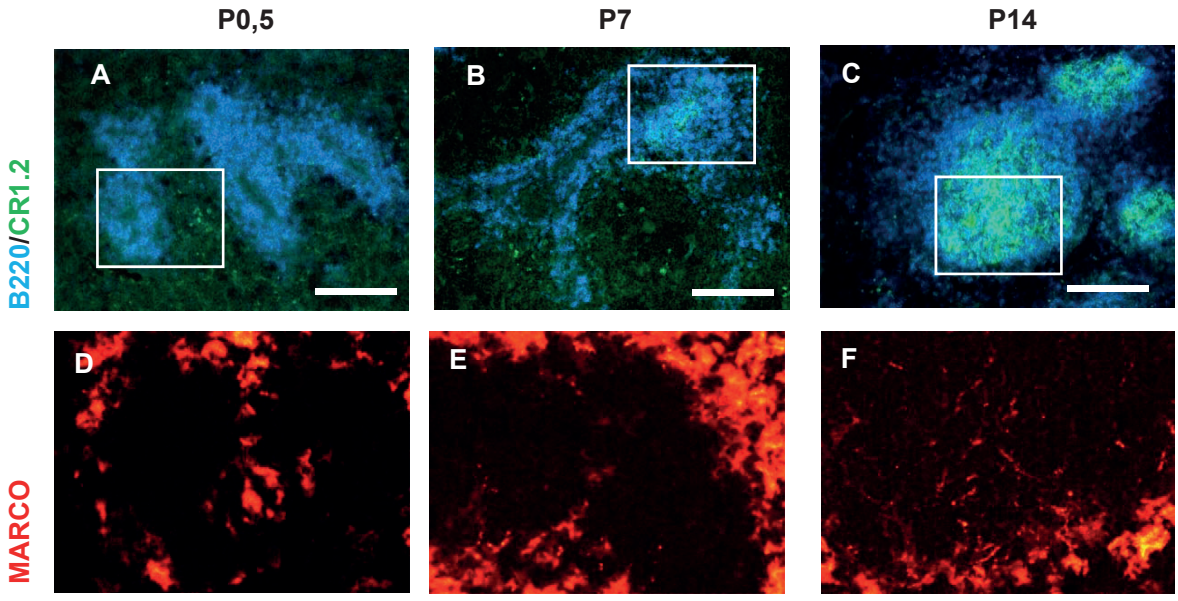
A következő kísérletben a hematopoetikus (MZ makrofág) eredetű MARCO follikuláris perzisztenciáját vizsgáltuk xenogén kimérák kialakításával, amiben az egér hematopoetikus sejteket patkány fehérvérsejtek helyettesítik. Irradiált BALB/c egerek patkány embrionális máj vagy újszülött csontvelői vérképző sejtekkel végzett rekonstitúciója után a kiméra lépekben csak a follikuláris MARCO maradt meg az intenzíven CR1.2-pozitív hálózathoz kapcsolódva, ami a recipiens radiorezisztens FDC-nek felel meg (Humphrey és mtsai, 1984).



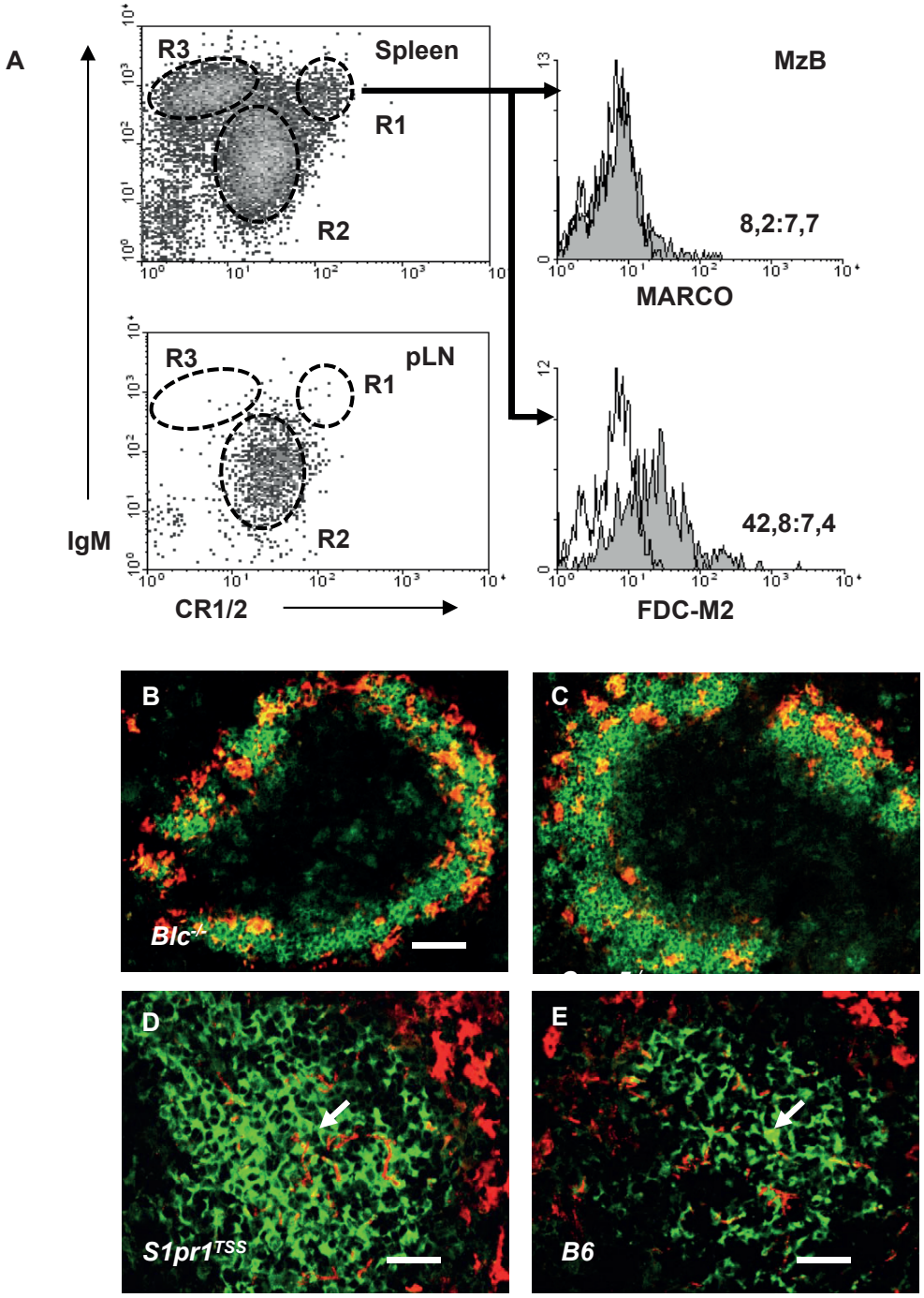
6.10. ábra: A MARCO scavenger receptor follikuláris elrendeződésének sejtes összetevői
A MARCO receptor a lépben (**A**) follikuláris felhalmozódást mutat (nyílhegyek) az intenzív marginális zóna makrofág expresszió (nyíl) mellett. A nyirokcsomóban (**B**) a MARCO csak a medulláris makrofágokban mutatható ki (nyíl). (**C**) Lép nyiroktüszőben a MARCO (vörös) a CR1.2 festéssel (zöld) azonosított FDC felületén fibrilláris kötegekbe rendezett granulált képleteket alkot (lépték A/B 100μm, C: 10μm).
A vad típusú C57Bl/6 lépben (**D**) a follikulusban kimutatható a MARCO (nyíl), míg a limfocita-hiányos *Rag1*$^{-/-}$ egér (**E**) LTβR-hiányos (*ltbr*$^{-/-}$) egér (**F**) és Nkx2-3-hiányos (*nkx2-3*$^{-/-}$) egér (**G**) lépében az anti-CR1.2 festéssel kimutatott FDC képződés zavara vagy a marginális zóna makrofágok hiánya miatt nincs follikuláris MARCO lerakódás. (**H**) Klodronát-liposzóma kezeléssel végzett MZ makrofág depléciót követően 48 óra múlva a follikuláris MARCO FDC-asszociált formában (nyíl) továbbra is fennmarad. Patkány → egér xenogén kimérában a MARCO a csontvelő-transzplantációt követően 6 héttel később (**I**) FDC-asszociált formában kimutatható (nyíl) (*n*=6, lépték D/I: 100μm). *Kellermayer Z, Fisi V, Mihalj M, Berta G, Kóbor J, Balogh P. Marginal Zone Macrophage Receptor MARCO Is Trapped in Conduits Formed by Follicular Dendritic Cells in the Spleen. J Histochem Cytochem. 2014 62:436-449.*

Ezen megfigyelések alapján mind a hematopoetikus (és γ-besugárzásra, valamint klodronát-deplécióra érzékeny) MZ makrofágokra (mint termelő sejtre) és a radiorezisztens FDC-re (mint megkötő sejtre) szükség van a MARCO follikuláris lerakódásához. A lerakódott MARCO viszonylag hosszú időn keresztül (az irradiációt követő rekonstitúció utáni 6 hét) kimutatható az FDC felületén. A különböző lép-szerkezeti eltérést okozó mutációkban, vagy *in vivo* MZ makrofág depléciót követően, valamint xenogén hematopoetikus rekonstrukció során létrejövő MARCO megoszlást a **6.10. ábra** mutatja.

Az egér lép stromális szerkezete – ennek részeként az FDC érés és MZ makrofág-elrendeződés – a posztnatális időszakban lezajló differenciálódási-átrendeződési események során alakul ki (Balogh és mtsai, 2001; Nolte és mtsai, 2003), ezért megvizsgáltuk a follikuláris MARCO megjelenését a születés utáni időszakban is. Hármas jelöléses immunfluoreszcens detektálással a MARCO, FDC (CR1.2) és B-sejtek (B220 marker) egyidejű kimutatásával újszülött, hét napos és tizennégy napos BALB/c egerek lépében vizsgáltuk a MZ és follikuláris MARCO jelenlétét és megoszlását. Újszülöttekben a fehér és vörös pulpát elválasztó, MARCO-pozitív makrofágok ellenére a conduit-mintázatot adó follikuláris MARCO nem volt kimutatható. A hetedik napra az elszórt CR1.2-pozitív FDC csoportosulások megjelenésével egyidejűleg a B-sejtek által kitöltött területeken MARCO-jelölődést találtunk. A második hétre a CR1.2-pozitív FDC-hálózat köré rendeződő nyiroktüszőkben a felnőttre jellemző follikuláris MARCO mintázatot tapasztaltuk (**6.11. ábra**). Ezen adatok alapján a follikuláris conduit-rendszerben történő MARCO lerakódást meghatározó esemény a normál lép fejlődése során az FDC megjelenése, ami a B-sejtes bevándorlás fokozódásához kapcsolódik.



6.11. ábra: A MARCO scavenger receptor follikuláris elrendeződésének posztnatális kinetikája
Többszörös immunfluoreszcens (B220/B-sejtek – kék, CR1.2/FDC – zöld, MARCO – vörös) jelöléssel az újszülött (P0,5, **A/D**), egy hetes (P7, **B/E**) és 2 hetes (P14, **C/F**) lépben a follikuláris MARCO a nyiroktüsző képződésével és az FDC megjelenésével párhuzamosan jelenik meg. A **D/F** képek a fehér négyszögeknek megfelelő területek MARCO festődését mutatják (*n*=5, lépték 100μm). *Kellermayer Z, Fisi V, Mihalj M, Berta G, Kóbor J, Balogh P. Marginal Zone Macrophage Receptor MARCO Is Trapped in Conduits Formed by Follicular Dendritic Cells in the Spleen. J Histochem Cytochem. 2014 62:436-449.*



6.12. ábra: A marginális zóna (MZ) MARCO follikuláris bejutása független a MZ B-sejtek mozgásától

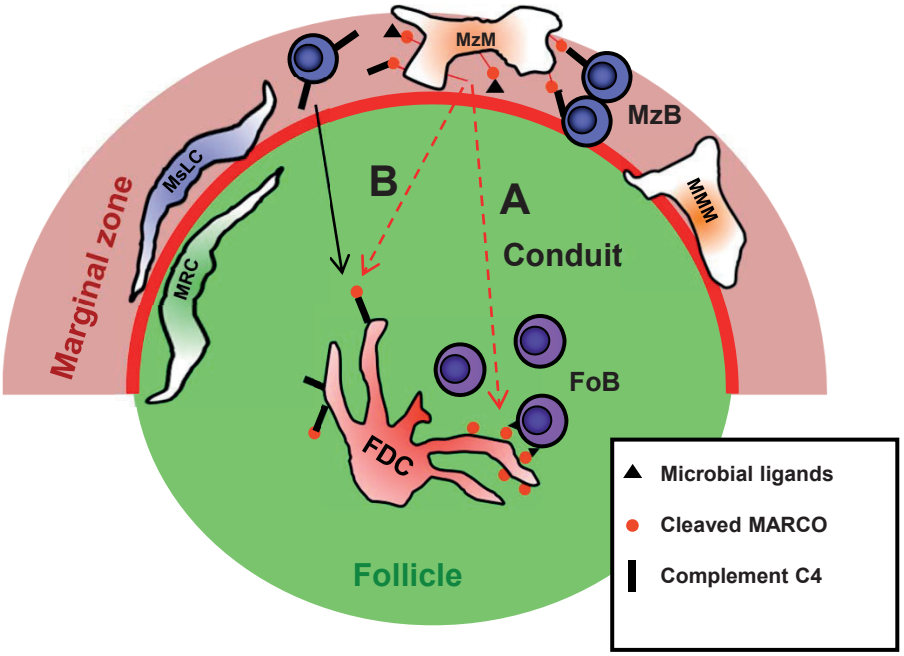
(**A**) BALB/c egerek lépsejtjei között az anti-CR1.2/IgM festéssel azonosított MZ B-sejtek (R1) felületén a MARCO nem detektálható, míg az FDC-M2 antitesttel kimutatható komplement C4 komponens kifejeződik. A nyirokcsomó (pLN) a CR1.2/IgM festés kontrollja, amiben csak a follikuláris B-sejtek (R2) vannak jelen. Az átfedő hisztogramokban a szürkével kitöltött görbe a jelzett antitestet (IBL-12 klón [anti-MARCO] és FDC-M2 klón [anti-C4]), az üres hisztogram az izotípus-kontrollt mutatja, a hisztogramok MFI értékeivel feltüntetve (*n*=5).

(**B-E**) képek a MARCO (vörös) és az FDC (CR1.2, zöld) megoszlását mutatják különböző B-sejt nyiroktüsző-vándorlásban gátolt egerek lép-mintáiban, ahol a Blc$^{-/-}$, (**B**) és Cxcr5$^{-/-}$ (**C**) hiányában FDC-deficiens egerekben nincs follikuláris MARCO, míg a szelektív MZ B-sejt mozgást gátló S1pr1TSS mutáció (**D**) nem akadályozza az FDC érést (nyíl) és follikuláris MARCO lerakódást, hasonló szöveti megoszlással, mint a kontroll C57Bl/6 egérben (**E**) (*n*=2–4, lépték a B/C képekben 100µm; a D/E képeken 20µm). *Kellermayer Z, Fisi V, Mihalj M, Berta G, Kóbor J, Balogh P. Marginal Zone Macrophage Receptor MARCO Is Trapped in Conduits Formed by Follicular Dendritic Cells in the Spleen. J Histochem Cytochem. 2014 62:436-449.*

6.5.3. A MARCO follikuláris eljuttatásához a B-sejtek nyiroktüsző-képzése szükséges a MZ B-sejt áthelyeződésétől függetlenül

Az MZ B-sejtek komplementtel fedett immunkomplexeket szállítanak a nyiroktüszőkbe azok FDC felszíni hosszú időtartamú retenciójához (Ferguson és mtsai, 2004; Cinamon és mtsai, 2008), amit egyidejűleg segít elő a MZ B-sejtek S1PR1 C-terminális részen bekövetkező deszenzitizációja és a Blc/CXCL13 kemokin B-sejt felszíni CXCR5 receptorhoz kötődése (Arnon és mtsai, 2011). Annak meghatározására, hogy a MZ B-sejtek szintén szerepet játszhatnak a MARCO follikuláris elhelyezésében, először a MARCO MZ B-sejt felszíni megjelenését vizsgáltuk. Áramlási citometriával a $B220^{+}/IgM^{hi}/CD21^{hi}$ alcsoportként meghatározott MZ B-sejtek nem hordoztak MARCO molekulát, ugyanakkor az FDC-M2 antitesttel kimutatható C4 komplement komponens a korábbi megfigyeléseknek megfelelően (Ferguson és mtsai, 2004) jelen volt a MZ B-sejteken (**6.12. ábra**).

A következő kísérletben a CXCL13/CXCR5 kemokin szignalizációs útvonalnak a MARCO follikuláris lerakódásában betöltött szerepét vizsgáltuk. A CXCL13 és CXCR5 hiányában a



6.13. ábra: A MARCO egér lépben lezajló follikuláris transzportjának hipotetikus sémája
A MZ makrofágok (MZM) MARCO scavenger receptort hordoznak (vörös rúd és kör) amelyek mikrobiális liganddal (fekete háromszög) vagy C4 komplement faktorral (fekete pálca) képezhetnek komplexet, és horgonyozhatnak le CD21 ligand-kötő MZ B-sejteket. Proteolitikus hasítást vagy egyéb lebontó eseményt követően a felszabaduló szolúbilis MARCO átszíváróghat a marginális szinuszon (vastag vörös vonal), így közvetlenül eljutva a nyiroktüszőben kialakult FDC-asszociált conduit rendszerbe (A-jelzett útvonal) vagy a MZ B-sejtek által korábban bejuttatott C4-hez kapcsolódva, ami az FDC felületi CD21-hez kötődik (B-jelzett útvonal). Így az FDC (CD21L-ként) C4-asszociált MARCO-t is megköthet, vagy a MARCO az FDC-asszociált conduit-ba ágyazottan mikrobiális ligand-kötő molekulaként azokat a follikuláris B-sejtek számára mutathatja be (szaggatott vörös vonalak). A marginális metallofil makrofágok (MMM), marginális szinusz endotél (MsLC), marginális retikuláris sejtek (MRC) lehetséges szerepe ismeretlen. A B-sejtek FDC-indukciós kölcsönhatásait nem ábrázoljuk. *Kellermayer Z, Fisi V, Mihalj M, Berta G, Kóbor J, Balogh P. Marginal Zone Macrophage Receptor MARCO Is Trapped in Conduits Formed by Follicular Dendritic Cells in the Spleen. J Histochem Cytochem. 2014 62:436-449.*

MARCO a MZ területére korlátozódik, a B-sejtek gyűrűszerű elrendeződésével és az FDC hiányával együtt (Förster és mtsai, 1996; Ansel és mtsai, 2000). A S1PR1 receptor C-terminálisában lévő AAA szekvencia TSS tripeptiddel való helyettesítése miatt inaktív receptor ($S1PR1^{TSS}$) meggátolja a MZ B-sejtek follikuláris belépését és az immunkomplexek FDC-re történő áthelyezését, ugyanakkor lehetővé teszi nyiroktüszők és FDC kialakulását (Arnon és mtsai, 2011). A MZ B-sejtek follikuláris kizárása ellenére a $S1PR1^{TSS}$ egerek lépében a nyiroktüszőben nagymennyiségű FDC-asszociált MARCO lerakódást találtunk (**6.12. ábra**). Ezek alapján a B-sejtek MZ-nyiroktüsző közötti áthelyeződése nem szükséges a MARCO follikuláris felhalmozódásához, ugyanakkor a B-sejtek CXCL13/CXCR5-irányított follikuláris felhalmozódása (és feltehetően ennek során az LTβR közvetítésével érvényesülő FDC-indukciós szerepe) elengedhetetlen a MARCO-conduitok létrehozásához.

A MZ MARCO follikuláris lerakódásának összetevői ezek alapján (1) a MZ makrofágok, mint MARCO forrás, (2) FDC, mint MARCO megkötő sejtek, és (3) B-sejtek, mint az FDC indukciójáért felelős sejtek. Az eddig ismert komplement receptor-ligand expressziós mintázatok és sejtes interakciók alapján feltételezhető MARCO felvételi folyamatokat a **6.13. ábra** szemlélteti (Kellermayer és mtsai, 2014). Egyelőre nem ismert, hogy a MARCO scavenger receptor FDC-hez kapcsolt follikuláris felhalmozódása (annak bakteriális ligand-kötő funkciójából adódóan) nyújthat-e más mintázat-felismerő receptorok számára lehetséges ligandokat (pl. LPS a TLR4 számára), ezáltal szövet-specifikus módon modulálva a lép nyiroktüszőben lévő B-sejtek aktivációs állapotát és válaszkészségét.

6.6. A LTβR szignalizáció és az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor eltérő szerepe az egér lép érmintázatának kialakításában

6.6.1. A lép érpályáinak fontosabb szabályzói

A lép érpályája alapvető szerepet játszik a nyirokszöveti kompartmentalizációban és az immunológiai válaszkészség kialakításában. A fehér pulpát a lép centrális arterioláinak végágai látják el. Ezek végágai kapillárisokban végződnek, amik a marginális szinuszba nyílnak, ahonnan a vért a vörös pulpa vénás szinuszai vezetik el (Steiniger és Barth 2000). Ezen anatómiai kompartmenteknek megfelelően az egér érpályákat bélelő endotél-sejtek között jelentékeny fenotípus-különbségek igazolhatók (Balázs és mtsai, 1999; Balázs és mtsai, 2001). A helyi limfocita-elhelyezkedésben betöltött szerepük mellett a vörös pulpa szinusz endotél részt vehet a helyi extramedulláris SLAM-pozitív ($CD150^+$, $CD244^-$, $CD48^-$) hematopoetikus őssejtek helyi szabályozásában is (Kiel és mtsai, 2005). Ez a közeli elhelyezkedés a hematopoetikus és endotél sejtek közötti esetleges ontogenetikai kapcsolatra utalhat, ami ezen viszonylag kevéssé tanulmányozott stromális sejt-összetevő részletesebb fejlődésbiológiai vizsgálatát indokolja.

Egérben a fehér pulpa centrális része és a MZ között a marginális szinusz képezi az anatómiai határfelületet. Az itt elhelyezkedő endotél és a velük szoros közelségben elrendeződő marginális retikulum sejtek (MRC) közös markere a MAdCAM-1 glikoprotein (Kraal és mtsai, 1995). Ezen fenotípus kialakulásának és fenntartásának fontos elősegítője a LTβR által közvetített szignalizáció, aminek célzott mutagenezissel illetve LTβR antagonista kezeléssel történő inaktiválása a MAdCAM-1 marker elvesztéséhez vezet. Így a MAdCAM-1 jelenléte a marginális szinusz és MZ stromális integritásának fontos paramétere (Mackay és mtsai, 1997).

A $MAdCAM\text{-}1^+$ endotél és MRC sejtek közvetlenül kapcsolódnak az itt elhelyezkedő MZ B-sejtekkel és különböző helyi szesszilis makrofág alcsoportokkal, melyeknek kitüntetett szerepük van a vérárammal bejutó antigénekkel szembeni immunválasz kialakításában és a bejutott antigének eltávolításában (Mebius és mtsai, 2004). Emellett a MZ a keringő fehérvérsejtek egyik elsődleges nyirokszöveti kilépési helye a lépben, bár ennek pontos sejtes és molekuláris összetevői csak részben ismertek.

A MAdCAM-1 kifejeződésében a LTβR/NF-κB szignalizációs tengely hatásán túlmenően az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor is fontos összetevőnek bizonyult (Pabst és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 2000). Nkx2-3 deficiens egerekben hiányzik vagy nagymértékben csökkent a PP, a kis és abnormális szerkezetű lép számos szöveti eltérése a LT hiányos állapothoz hasonlít. A centrális fehér pulpa defektusai (follikulusok és T/B elkülönülés hiánya) mellett az egerek MZ összetevői (MZ B-sejtek, makrofágok és MAdCAM-1-pozitív stromális elemek) sem mutathatók ki. Ugyanakkor a LT-hiányban megfigyelt kiterjedt nyirokszöveti fejlődési eltérésekkel ellentétben Nkx2-3 hiányában a nyirokcsomók kifejlődnek, valamint a lépben FDC-csoportosulások is megjelennek (Tarlinton és mtsai, 2003).

Az egér lép különböző endotél-alcsoportjaival szemben kifejlesztett patkány monoklonális antitestekkel végzett vizsgálataink a lép érszakaszait bélelő endotél nagyfokú regionális heterogenitását igazolták (Balázs és mtsai, 2001). A következő munkában ezeknek a markereknek és a MAdCAM-1 glikoproteinnek a kifejeződése közötti viszonyt vizsgáltuk, és összehasonlítottuk a TNF/LT szignalizációs útvonal különböző komponenseinek, valamint az Nkx2-3 hiányának az érfejlődésre gyakorolt hatását. Eredményeink a LT útvonal és az Nkx2-3 morfogén szerepének kompartmentektől függően eltérő fontosságú szerepét igazolják, amiben az Nkx2-3 a LTβR hatásától független módon elsősorban a lép vörös pulpa fejlődését irányítja, míg a marginális szinusz differenciálódása mindkét összetevő aktivitását igényli (Balogh és mtsai, 2007).

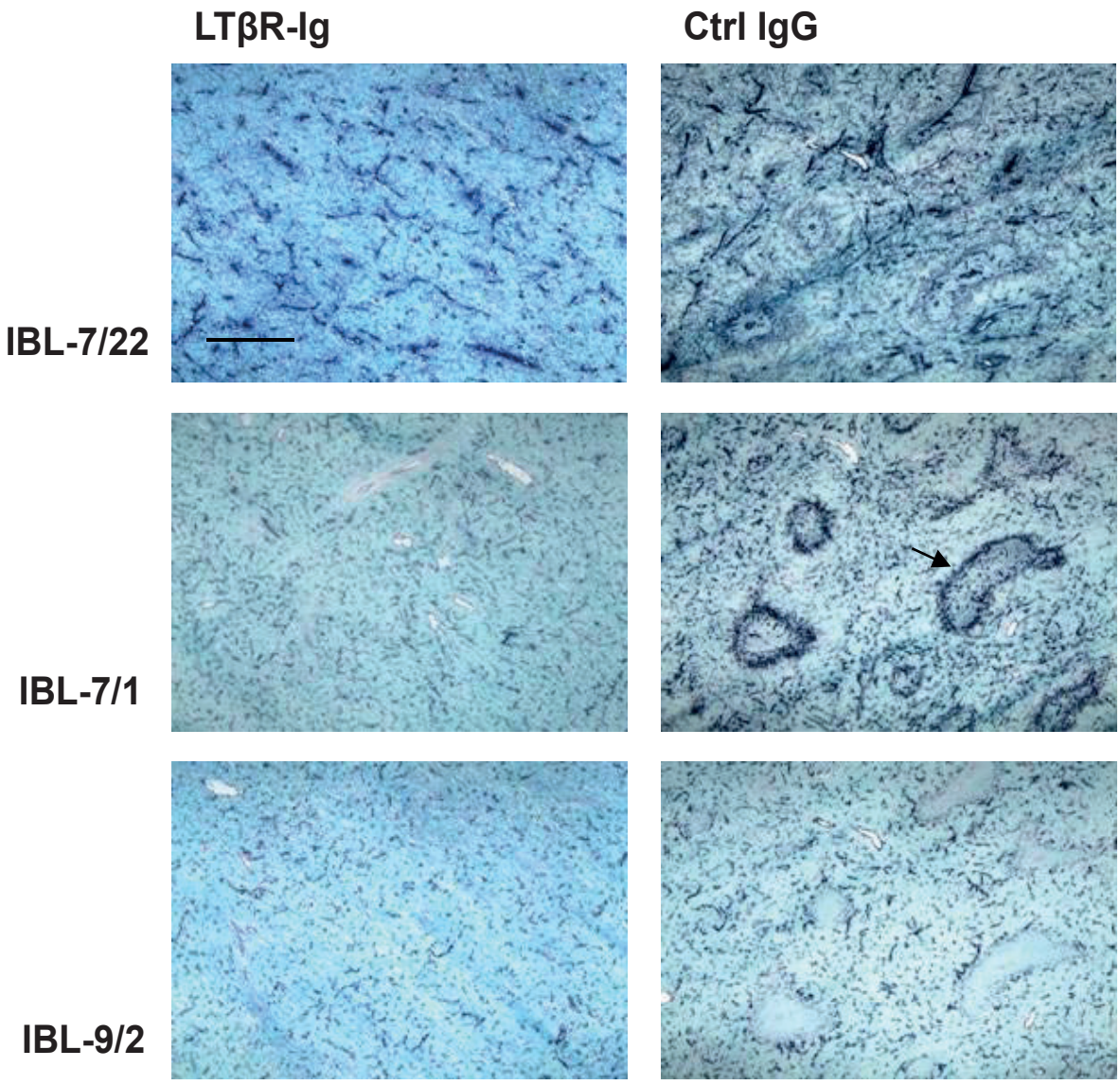
6.6.2. A LTβR újszülöttkori gátlása a marginális szinusz fejlődésének gátlását váltja ki

A felnőtt egerek MZ stromális sejtjeire és a marginális szinusz endotélre jellemző MAdCAM-1 antigén kifejeződése korábbi vizsgálatok eredményei alapján rendkívül érzékeny a LTβR folyamatos működésére (Rennert és mtsai, 1996; Mackay és mtsai, 1997). Az IBL-7/1 antitest által felismert marker és a MAdCAM-1 antigén kifejeződésének topográfiai közelsége miatt először a LTβR-Ig szolúbilis inhibitor hatását vizsgáltuk. Újszülött egér egyszeri 50 μg dózisú intraperitoneális oltása az IBL-7/1 és IBL-7/22 antitestekkel a posztnatális 10. napon elvégzett immunhisztokémiai vizsgálat szerint a fejlődő marginális szinusz differenciálódásának súlyos fokú gátlását eredményezte. Ugyanakkor a vörös pulpa rajzolat nem tért el a LTβR-Ig által blokkolt és kontroll egerek között, beleértve a helyi IBL-7/1-pozitív érelemeket is. A marginális szinusz károsodott elrendeződése nem vezetett az IBL-9/2-pozitív vörös pulpa összetevők ektópiás megjelenéséhez a fehér pulpán belül.

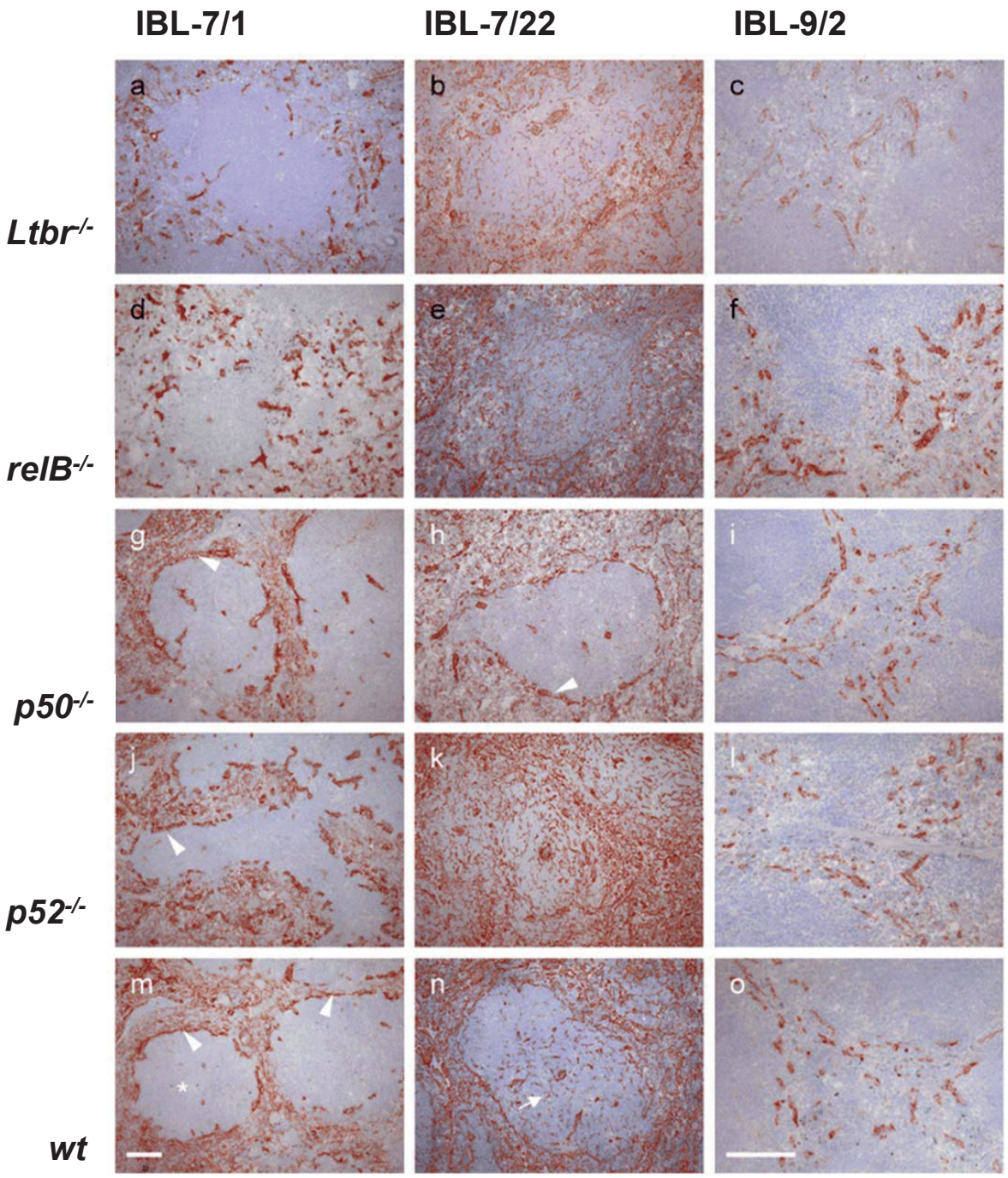
A marginális szinusz kiterjedt érési gátlása mellett a LTβR-Ig injektálása a retikuláris alapváz normál kompartmentalizációját is gátolta, amit az IBL-7/22 reaktivitás eltérése alapján azonosítottunk (**6.14. ábra**). Ugyanakkor a marginális szinusz érésének LTβR-Ig által kiváltott gátlása csak az újszülött állatokban érvényesült, ugyanis felnőtt egerekben a LTβR-Ig-kezelés csak a MAdCAM-1 elvesztéséhez vezetett, az IBL-7/1 marginális szinusz-rajzolata nem változott még nagyobb dózisú inhibitor adása esetén sem.

A LTβR-hoz annak elsődleges $LT\alpha\beta_2$ ligandja mellett a LIGHT is kapcsolódik, és mindkét ligand jórészt egymásnak megfelelő hatást fejt ki a perifériás nyirokszövetek érésében (Wang és mtsai, 2002). A LTβR ligand pontos megállapítására egy neutralizáló anti-LTβ antitestet használtunk, amivel a LTβR-Ig bejuttatásának megfelelő hatást észleltünk. Így a LTβR-Ig gátló hatása a $LT\alpha\beta_2$ domináns, valószínűleg kizárólagos ligand-szerepét jelzi.

A T- és B-sejtek differenciálódásának korai szakaszát érintő SCID mutációban a limfocita-defektus következtében a perifériás nyirokszövetek csökevényesen fejlettek. A limfocita-hiány ellenére a SCID egerek lépében mind a MAdCAM-1 antigén és az IBL-7/1 marker expresszálódott, ami ezen érszakaszok fejlődésének az antigén-receptort hordozó T- és B-sejtektől való függetlenségére utal, a szükséges morfogenetikai szignálokat egyéb fehérvérsejtek is elégséges



6.14. ábra: Az egér lép marginális szinusz posztnatális fejlődésének gátlása a LTβR blokkolásával
Újszülött (0,5 napos) BALB/c egerek 50μg szolúbilis LTβR-Ig fúziós fehérjével való oltása után a 10. napon a jelzett antitestekkel végzett immunhisztokémiai festéssel a fehér pulpa IBL-7/22-pozitív retikuláris alapváz kompartmentalizációjának elmaradását, az IBL-7/1-pozitív marginális szinusz endotél-sejtek (nyíllal jelzett) csoportosulásának gátlását figyelhetjük meg, ugyanakkor a vörös pulpa IBL-9/2-pozitív ér-mintázata nem tér el a kontroll IgG-vel kezelt mintától (*n*=4, lépték 100 μm). *Balogh P, Balázs M, Czömpöly 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 328:473-86.*



6.15. ábra: A LTβR és nem-kanonikus NF-κB szignalizációs komplex tagjainak szerepe az egér lép érhálózatának kialakításában

A különböző mutáns egerekből származó lépmetszeteken a jelzett antitestekkel elvégzett immunhisztokémiai jelölés után a kontroll (wt) mintához hasonlítva a megfigyelt szerkezeti eltérések alapján a LTβR feltehetőleg a RelB/p52 összetevőkön keresztül irányítja a marginális zóna IBL-7/1-pozitív érpálya kialakulását (nyílhegyek) és a lép fehér pulpa IBL-7/22-reaktív retikuláris kompartmentalizációját (nyíl). A vörös pulpa domináns IBL-9/2-pozitív érhálózata ezektől függetlenül alakul ki (*n*=5, lépték 100 μm). *Balogh P, Balázs M, Czömpöly 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 328:473-86*

mennyiségben szolgáltatják. Ugyanakkor a SCID lép fehér pulpa állományának éretlen szerveződésére utal az IBL-7/22-pozitív retikuláris rajzolatának diffúz elrendeződése, míg a vörös pulpa IBL-9/2 antitesttel azonosított szinusz-hálózata normál megoszlást mutatott.

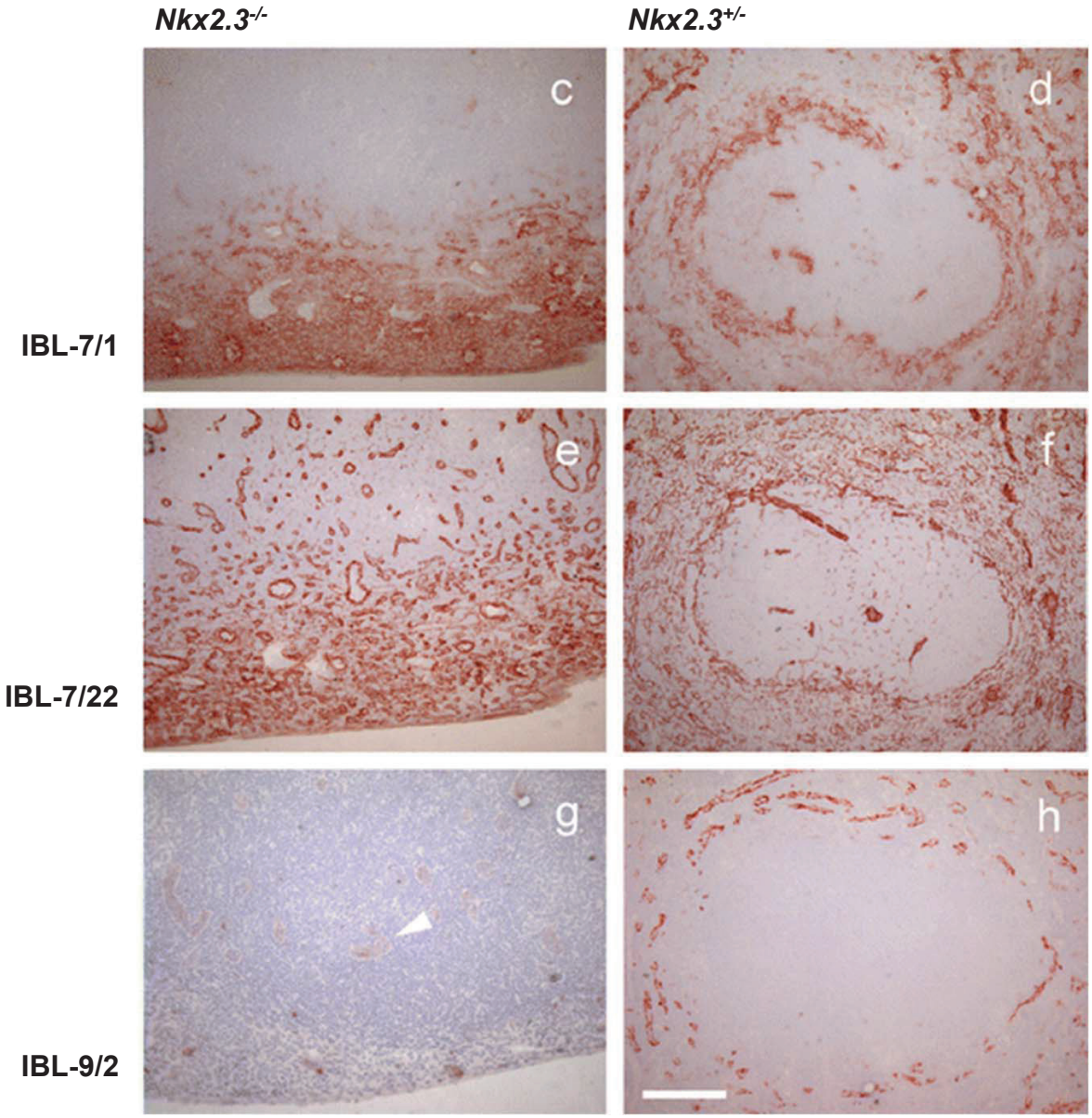
6.6.3. A NF-κB komplex RelB, p50 és p52 tagjainak eltérő szerepe a marginális szinusz képződésében

Ligand kötését követően a LTβR az NF-κB transzkripciós faktor-család több tagját és útvonalát aktiválja. Ezek közül a nem-kanonikus útvonalban szereplő RelB és (az inhibitor hatású p100 NIK/IKK általi hasítással generált és foszforilált) p52 összetevők számos és szerteágazó szerepet töltenek be a lép fejlődésében (Poljak és mtsai, 1999; Weih és mtsai, 2001; Weih és Caamano 2003). A munkánk további szakaszában ezért a LTβR szignalizációjában résztvevő NF-κB komponensek hiánya miatt kialakuló eltéréseket vizsgáltuk LTβR-mutáns, LTβR-Ig-vel vagy anti-LTβ antitesttel kezelt állatok lépéhez hasonlítva. A legsúlyosabb eltérést a LTβR és RelB mutánsokban észleltük, ahol a marginális szinusz sem az IBL-7/1 és IBL-7/22 antitest által felismert markereket, sem a MAdCAM-1 molekulát nem expresszálta (Weih és mtsai, 2001). Ezekben a mutánsokban a T-sejt zóna retikuláris komponenseinek elrendeződése diffúz rajzolatot mutatott. A p52-hiányos egerekben a marginális szinusz IBL-7/22 markere hiányzott, az IBL-7/1 megtartott volt, ugyanakkor a fehér pulpa IBL-7/22 rajzolata a RelB-hiányos mintához hasonlóan diffúz volt. A p50 hiánya nem járt kimutatható érszerkezeti eltéréssel, illetve a vörös pulpa rajzolatát egyik NF-κB tag hiánya sem befolyásolta (**6.15. ábra**).

Az NF-κB aktiváció mértékének fontosságára utal, hogy míg hiányában a marginális szinusz fejlődése gátolt, a p100-hiányos/p52 knock-in egerekben a konstitutív nem-kanonikus NF-κB aktiváció a vörös pulpában perifériás nyirokcsomó addresszint (PNAd) kifejező ektópiás HEV képletek megjelenését váltja ki (Guo és mtsai, 2007).

6.6.4. Az Nkx2-3 hiánya a vörös pulpa vaszkuláris atrófiáját indukálja

Az Nkx2-3 és Nkx2-5 a Drosophila *tinman* génjének két emlős homológja, amelyek az idegszövetek és számos hasüregi zsigeri szerv fejlődésében szerteágazó funkciókat látnak el (Price és mtsai, 1992; Evans és mtsai, 1995; Pabst és mtsai, 1998; Qiu és mtsai, 1998; Sussel és mtsai 1998). Az Nkx2-3 *in vitro* a MAdCAM-1 promótert aktiválja (Pabst és mtsai, 2000). Az LTβR-hiányával szemben Nkx2-3 mutáns egerekben a lép a normálisnál jóval kisebb méretű, a vörös pulpa gyakran a szerv széli részén lévő foltszerű formában mutatkozik. Az Nkx2-3-hiányos egerekben a fehér pulpa retikuláris alapváza az IBL-7/22 immunhisztokémiai jelöléssel diffúz elrendeződést mutat a normál T/B kompartmentalizációnak megfelelő elkülönülés helyett. A MAdCAM-1 hiánya mellett a marginális szinusz szerkezeti károsodását igazolja az IBL-7/1 marker hiánya is. A legsúlyosabb mértékű károsodás a vörös pulpa IBL-9/2-pozitív ereinek hiánya, valamint az IBL-7/1-pozitív szegmentumok perifériás kompaktálódása (**6.16. ábra**). A vörös pulpa károsodott differenciálódása már újszülöttkorban is kimutatható, így a normál újszülöttek viszonylag kiterjedt vörös pulpa IBL-9/2-pozitív szinusz-hálózatával (Balázs és mtsai,



6.16. ábra: Az Nkx2-3 hiányának hatása az egér lép ér-kompartmentek kialakulására
Fiatal felnőtt (6-8 hetes) Nkx2-3 hiányos (**c/e/g**) és haploinszufficiens (**d/f/h**) egerek lép-mintáinak immunhisztokémiai vizsgálata az IBL-7/1-pozitív komponensek összecsapzódását, marginalizálódását, és a fehér pulpa IBL-7/22-pozitív retikuláris rajzolat átalakulását mutatja. A heterozigóta mintában a normálnak megfelelő vörös pulpa IBL-9/2-pozitív ér-rajzolat helyett az Nkx2-3- hiányos mintában néhány gyengén festődő IBL-9/2 pozitív érelem látható (nyílhegy) (*n*=6, lépték 100 μm). *Balogh P, Balázs M, Czömpöly 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 328:473-86*

2001) szemben Nkx2-3-deficiens egerek lépében ezek a struktúrák szinte teljesen hiányoznak (Balogh és mtsai, 2007).

Az egyes irányított mutációknak a lép különböző kompartmentjeit érintő ér-szerveződési következményeit a **VI. táblázat** mutatja. Ezek alapján a LTβR valószínűleg a RelB részvételével történő nem-kanonikus NF-κB szignálútvonal révén fejt ki szabályzó hatást a lép marginális szinusz érésére, aminek elmaradása a MAdCAM-1 hiánya mellett az IBL-7/1 markert hordo-

VI. táblázat

Mutáció/kezelés	Marginális szinusz			Vörös pulpa szinuszok		
	IBL-7/1	IBL-7/22	IBL-9/2	IBL-7/1	IBL-7/22	IBL-9/2
LTβR$^{-/-}$	-	-	-	+	+	+
RelB$^{-/-}$	-	-	-	+	+	+
p52$^{-/-}$	+	-	-	+	+	+
p50$^{-/-}$	+	+	-	+	+	+
Nkx2-3$^{-/-}$	-	-	-	++	+	-
LTβR-Ig (újszülött)	-	-	-	+	+	+
anti-LTβ IgG (újszülött)	-	-	-	+	+	+
LTβR-Ig (felnőtt)	+/-*	+	-	+	+	+
SCID	+	+	-	+	+	+
Vad típus	+	+	-	+	+	+

zó endotél-sejtek differenciálódását is gátolja, ugyanakkor nincs következménye a lép vörös pulpa endotél-alcsoportok és érszakaszok megjelenésére. A lép ér-mintázat kialakításában az Nkx2-3 transzkripciós faktor kiterjedt szerepét jelzi, hogy hiányában a marginális szinusz defektusa mellett a vörös pulpa is kóros szerkezetű, aminek legjellemzőbb következménye a vörös pulpa IBL-9/2–pozitív szinusz-alcsoportjának a teljes hiánya (Balogh és mtsai, 2007). Bár a vörös pulpa immunológiai szerepe a kutatások során viszonylag kisebb teret kap a centrális fehér pulpa illetve a MZ jelentőségéhez képest, a közelmúltban nyert adatok alapján a B- és $CD8^+$ T-sejtek vörös pulpába történő korai homingjában a vörös pulpa szinusz endoteliális Clever-1 scavenger receptor fontos szerepet játszik (Tadayon és mtsai, 2019).

6.7. Az Nkx2-3 transzkripciós faktor szabályozza az egér lép érpálya-mintázatát és limfocita homing folyamatát

A lép fejlődése a mezenhímális előalakjának specifikációjával kezdődik, amelynek meghatározásában a Pbx1, Nkx3-2/Bapx1, Tlx1/HOX11 és Nkx2-5 transzkripciós faktorok együttes hatása érvényesül (Brendolan és mtsai, 2005; Brendolan és mtsai, 2007). Ezen faktorok bármelyikének hiánya a lépfejlődés korai gátlásához és léphiányhoz vezet. A fentiek mellett a Barx1 transzkripciós faktor is a fentiektől függetlenül szabályozza a lép fejlődését, és a gyomor fejlődésében is szerepet játszik (Kim és mtsai, 2007).

A lép fejlődésének gátlásával ellentétben a Tlx1 hiánya nem befolyásolja a nyirokcsomók kialakulását (Wardemann és mtsai, 2002). A Pbx-1 és Nkx2-5 embrionális letalitást okozó hiánya miatt nincs lehetőség ezen transzkripciós faktorok nyirokcsomó-fejlődésben játszott szerepének meghatározására (Lyons és mtsai, 1995; Lettice és mtsai, 1999; Selleri és mtsai, 2001).

Korábbi kutatások során az Nkx2-3 transzkripciós faktorról igazolódott, hogy a lép fejlődésében fontos szerepet tölt be (Pabst és mtsai, 1999; Pabst és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 2000), ugyanakkor nem hat a nyirokcsomók fejlődésére. Az Nkx2-3 a 18 tagból álló, konzervált szerkezetű és hasonló DNS-szekvenciához kapcsolódó Nk család egyike. Ez a transzkripciós faktor csoport egy bonyolult kifejeződési mintázat mentén fontos szerepet játszik számos zsiger mezenhímájának differenciálódásában, így a szív, tüdők, hasnyálmirigy, emésztőrendszer fejlődésében (Stanfel és mtsai, 2005). A következőkben az Nkx2-3 által kiváltott lép ér-mintázat változás funkcionális jellemzőit ismertetjük. Az Nkx2-3 inaktiválása a lépben PNAd-pozitív ektópiás HEVek megjelenéséhez vezet, amelyek CCL21 kemokint képeznek és L-szelektin-függő limfocita-homingban vesznek részt. Az ektópiás HEV-ek megjelenése a nyirokcsomó HEV-hez hasonlóan LTβR-közvetítette szignalizációt igényel. A marginális szinusz hiánya mellett a MZ további károsodását jelzi a vérárammal bejutó kórokozók csökkent mértékű megkötése. Megfigyeléseink szerint a lép érmintázatának meghatározásában az Nkx2-3 alapvető szerepet tölt be, és hiányában a limfocita belépés és patogén-szűrési funkciók súlyos mértékben károsodnak (Czömpöly és mtsai, 2011).

6.7.1. Az Nkx2-3 hiányának hatása a HEV-fejlődéshez/funkcióhoz kapcsolódó gének kifejeződésére a lépben

Kutatócsoportunk és mások korábbi tanulmányai kimutatták, hogy az Nkx2-3 hiánya számos szerkezeti eltérést okoz a mutáns egerek lépében (Pabst és mtsai, 2000; Bovári és mtsai, 2007; Balogh és mtsai, 2007), amik a lépre speciálisan jellemző és a limfociták helyi megtelepedésében fontos szerepet játszó marginális szinuszt és vörös pulpa szinuszokat érintik. Ezeknek az ér-típusoknak a hiánya ellenére a mutáns lépekbe irányuló limfocita-megtelepedés a lépben fennálló szelektív homing fennállását jelzi, ezért munkánk első szakaszában vizsgáltuk az endotél sejtekben a szövet-specifikus homingban szereplő gének kifejeződését qPCR eljárással, azokat nyirokcsomóhoz és vad típusú léphez hasonlítva.

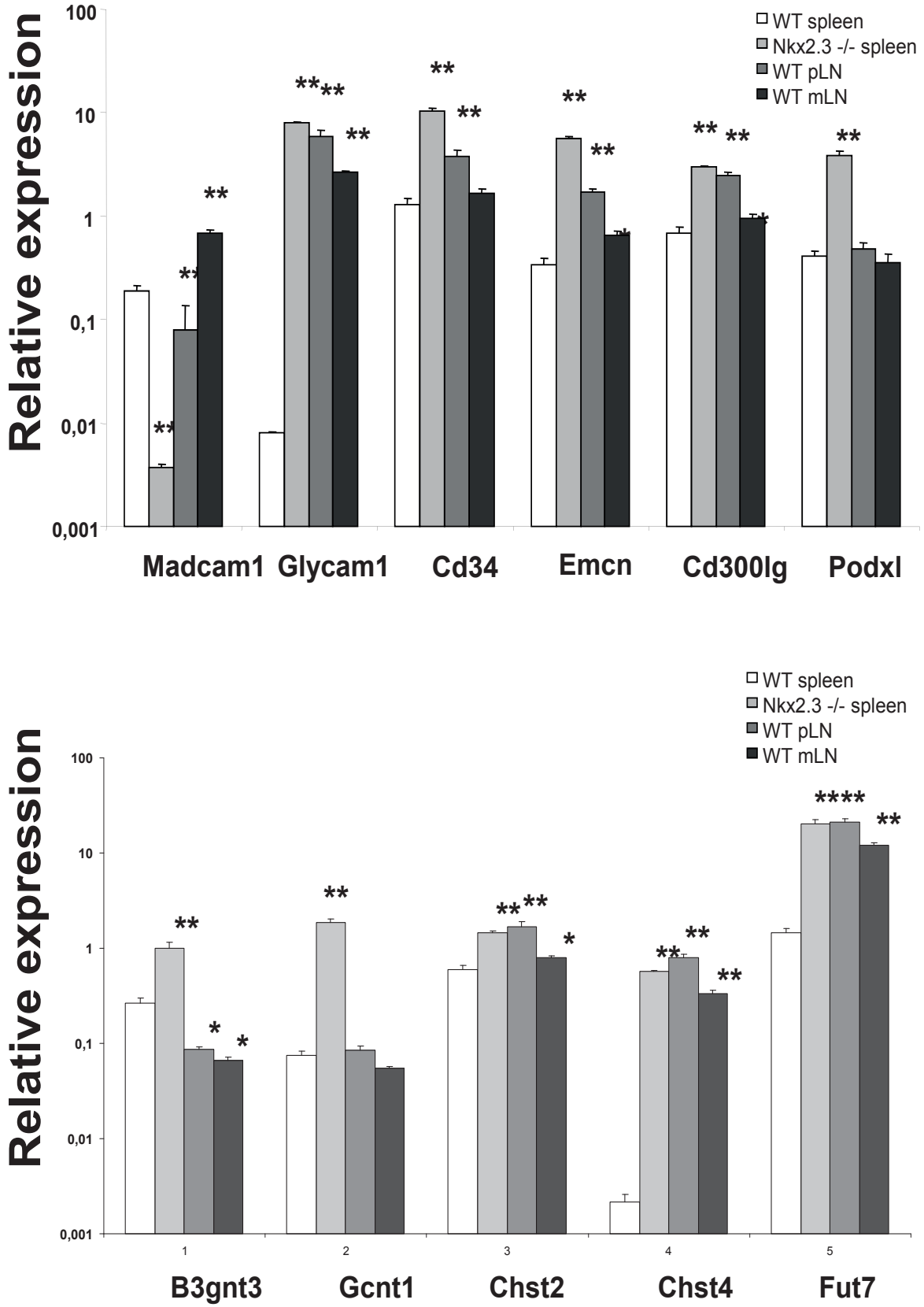
Az értékelés során a mutáns lépben a MAdCAM-1 mRNS nagymértékű csökkenését tapasztaltuk, megerősítve a korábbi beszámolókat (Pabst és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 2000). Ezzel szemben a GlyCAM-1 kifejeződése a vad típusú kontrollhoz képest drámai (10.000-szeres értéket meghaladó) mértékben fokozódott, míg egyéb marker-gének, pl. CD34, endomucin (Emcn), CD300 antigen like family member G (Cd300lg/nepmucin), és podocalyxin-szerű protein (Podxl) mRNS szintje ennél jóval kisebb mértékben emelkedett (4-16x értékben). A GlyCAM-1 mRNS-szint emelkedése és a MAdCAM-1 csökkenése a globális mRNS-változásokkal együtt a mutáns lépek mRNS mintázatát a perifériás nyirokcsomók mintázatához tette hasonlóvá.

A GlyCAM-1 és MAdCAM-1 egyaránt működhet a perifériás nyirokcsomók PNAd addresszin kialakításában váz-fehérjeként, ami komplex glikozilációs folyamat révén válik alkalmassá a recirkuláló limfociták felszínén kifejeződő L-szelektin felismerésére. A szükséges glikozilációs, szulfatációs és egyéb módosító reakciókat a B3gnt3 és Gcnt1glikoziltranszferáz, Chst2 és Chst4/HEC-GlcNAc6ST szulfotranszferázok és Fut7 fukoziltranszferáz végzik (Rosen, 2004). A modifikáló enzimek mRNS qPCR analízise során ezeknek a géneknek változó mértékű, de jellemzően fokozott mRNS kifejeződését találtuk Nkx2-3-deficiens lépben. A funkcionális PNAd kialakításában az egyik kulcsenzim Chst4 szulfotranszferáz a mutáns lépben szintén jelentős emelkedést mutatott. Az Nkx2-3 hiányának következtében a lépben a MAdCAM-1 fehérjét a GlyCAM-1 helyettesíti, és a PNAd-generáló enzimek jelenléte a perifériás nyirokcsomó PNAd-képző összetevők (váz-fehérjék és módosító enzimek) mintázatához hasonló génexpressziós profilt eredményez (**6.17. ábra**).

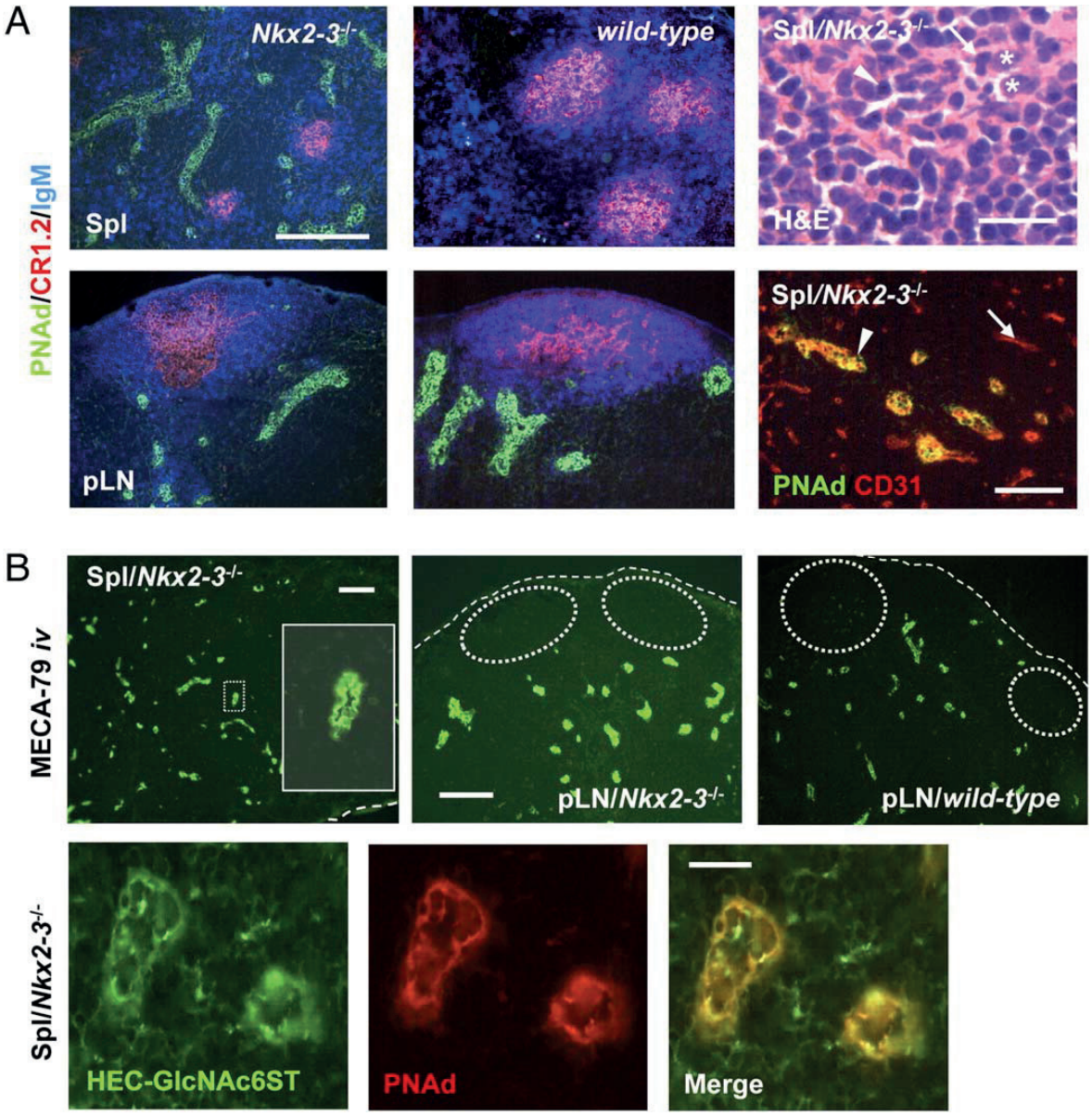
6.7.2. Ektópiás HEV-szerű erek képződése az Nkx2-3$^{-/-}$ mutáns lépben

A HEV-hez kapcsolódó gének mRNS-einek perifériás nyirokcsomó-szerű kifejeződési mintázata miatt a PNAd jelenlétét az Nkx2-3 lépek immunhisztokémiai vizsgálatával tanulmányoztuk. A MECA-79 anti-PNAd antitesttel (Streeter és mtsai, 1988) a mutáns lépekben B-sejt gazdag csoportosulásokhoz közeli elrendeződésben intenzív és specifikus HEV-szerű jelölődést észleltünk, hasonló képletek a normál lépben egyáltalán nincsenek. A szulfotranszferáz HEC-GlcNAc6ST (Chst4) enzimmel (Hemmerich és mtsai, 2001) és a MECA-79 PNAd epitóppal szembeni kettős immunfluoreszcencia a perifériás nyirokcsomó HEV-hez hasonló szoros ko-lokalizációt mutatott a mutáns lépek HEV-szerű erein.

A PNAd epitóp intravaszkuláris kifejeződését a MECA-79 anti-PNAd intravénás oltásával vizsgáltuk. Az Nkx2-3-hiányos lépben és a nyirokcsomókban erőteljes luminális reaktivitást tudtunk kimutatni, míg a vad típusú lépben nem volt értékelhető reaktivitás. Ezen adatok alapján a PNAd epitóp a luminális endotél-felületen való megjelenése révén hozzáférhető lehet a fehérvérsejtek számára (**6.18. ábra**), elősegítve azok lépbe való eljutását. A mutáns lépek limfocita-összetételét áramlási citométerrel vizsgáltuk. A normál léphez viszonyítva a limfoid sejtek között a T-sejtek és az L-szelektin-pozitív sejtek gyakoriságának emelkedését találtuk, ezáltal a mutáns lép limfoid összetétele is a nyirokcsomókéhoz hasonlított (**6.19. ábra**).

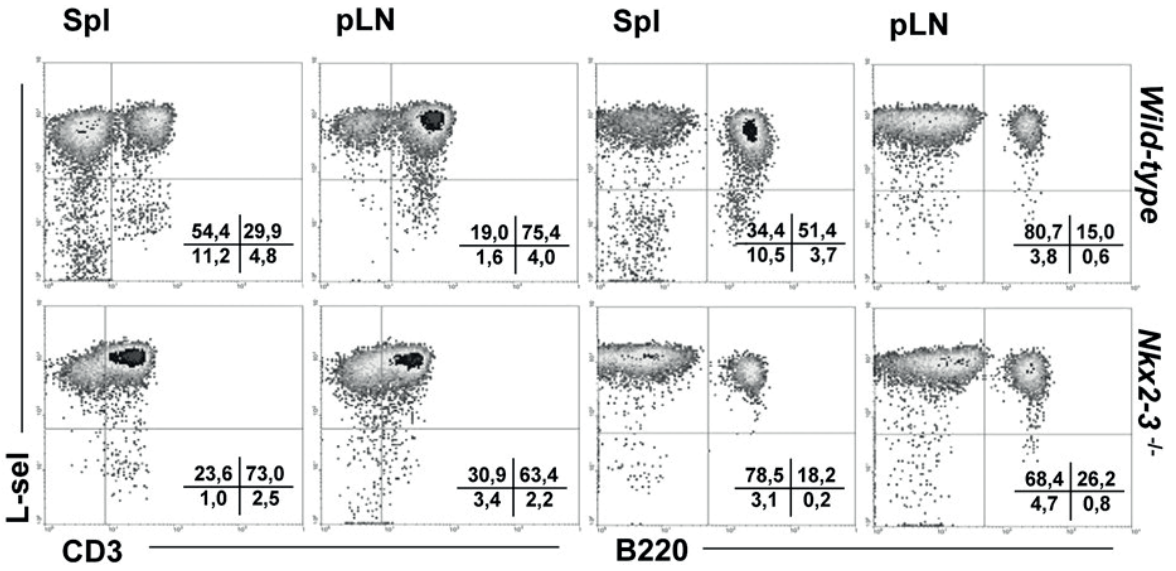


6.17. ábra: A PNAd vázfehérjék (A) és módosító enzimek (B) mRNS kifejeződésének qPCR analízise
Nkx2-3$^{-/-}$ és normál (WT) lép, perifériás (pLN) és hasi (mLN) nyirokcsomók mRNS értékei a normál szövetekben mért cél mRNS:β-aktin arányhoz viszonyítva (y=1), hat párhuzamos minta átlaga ± SD, szervenként 3 egér felhasználásával *$p < 0,05$, **$p < 0,001$. *Czömpöly T, Lábadi 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 186:6981-9.*



6.18. ábra: BALB/c egérben az Nkx2-3 hiánya a lép HEV képződéséhez vezet

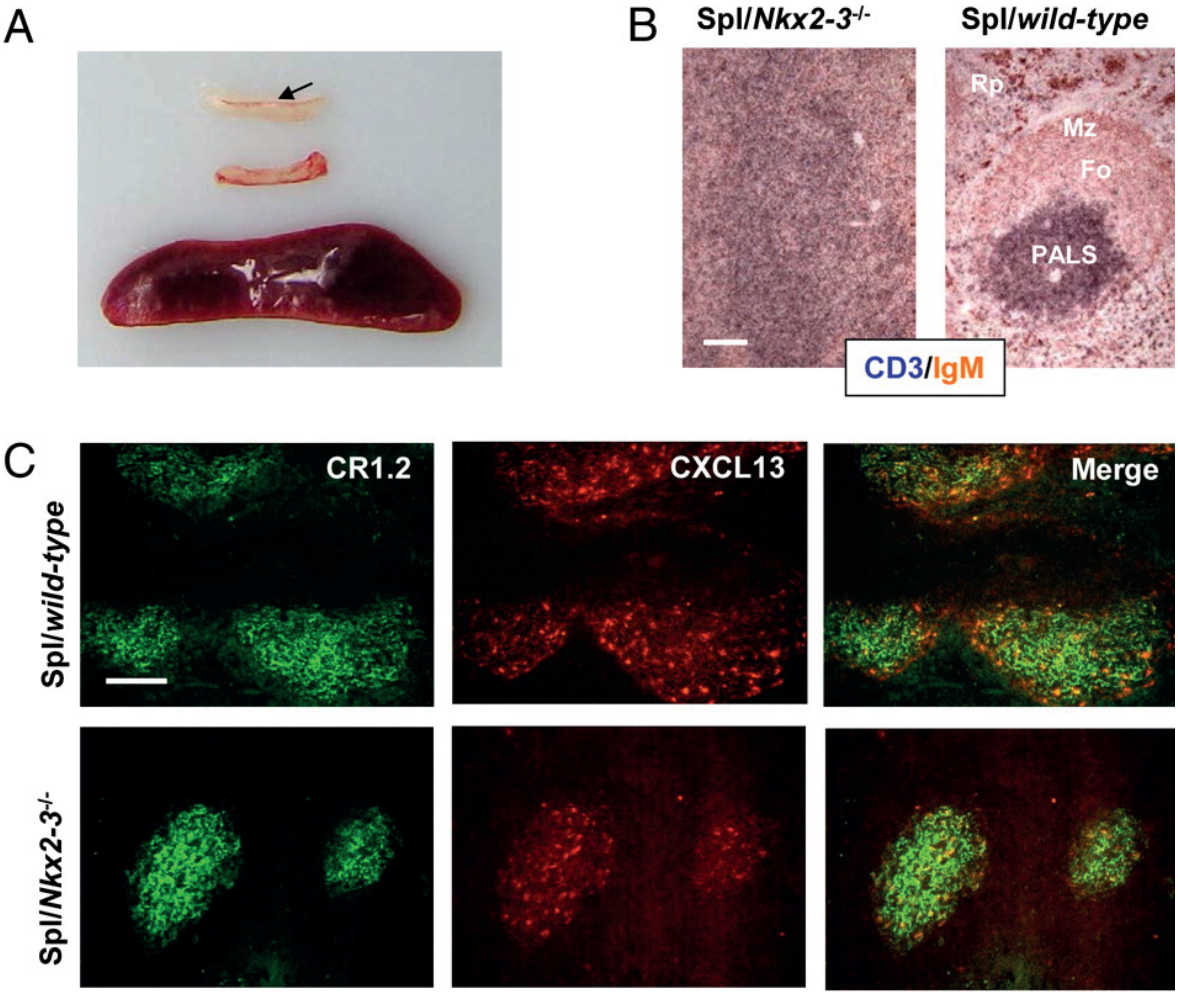
(**A**) Fagyasztott lépmetszetek és nyirokcsomó (pLN) metszetek immunfluoreszcens jelölése a megadott antitestekkel illetve hematoxilin-eozinnal (H&E). A lila jelölés az FDC átfedő reaktivitását jelzi az FDC-n kifejeződő CR1.2 és a szomszédos B-sejtek IgM festődése miatt. Lépték= 100 μm. A lép H&E festés megvastagodott HEV endotél sejteket (csillag) és ahhoz szorosan kapcsolódó limfocitát (nyílhegy) vagy transzmigráló sejtet (nyíl) ábrázol. Lépték=25 μm. A CD31-poztív endotél sejtek egy része ko-expresszálja a PNAd molekulát (jobb alsó kép, lépték= 100 μm). (**B**) A PNAd epitóp az Nkx2-3 mutáns lép (bal felső kép), valamint a mutáns és normál nyirokcsomók HEV luminális felületén helyezkedik el FITC-konjugált MECA-79 anti-PNAd antitest intravénás oltásával kimutatva. A szaggatott vonalak a szövet határát jelzik. A téglalap a pontozott vonalnak megfelelő területet mutatja nagyítva (60x objektív nagyítás). A nyirokcsomó metszetekben a szaggatott vonal a nyiroktüszőket jelöli. Az alsó sorban az *Nkx2-3*$^{-/-}$ lép PNAd-pozitív HEV metszetek HEC-GlcNAc6ST szulfotranszferáz enzim festődését mutatja. Lépték= 50 μm. Reprezentatív képek három egéren elvégzett, háromszor megismételt immunhisztológiai jelölésből. *Czompöly T, Lábadi 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 186:6981-9.*



6.19. ábra: Az Nkx2.3$^{-/-}$ és normál lép és nyirokcsomók sejtösszetétele
A reprezentatív képek a T:B arányt és az L-szelektint (L-sel) hordozó sejtek arányát mutatják. A számok a limfocita kapun belül az egyes kvadránsokban lévő sejt-gyakoriságot mutatják. A képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett mérés reprezentatív eredményét ábrázolják. *Czömpöly T, Lábadi 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 186:6981-9.*

Több alkalommal tapasztaltuk, hogy a BALB/c alapra visszakeresztezett Nkx2-3 mutáns egerek kb. 70%-ában a lép minimális reziduális vörös pulpát tartalmazott, amiket ezért *„redless"* variánsnak neveztünk. Az ilyen fenotípusú lépben lévő T- és B-sejtek teljesen kitöltötték a lépet, a MZ összetevőinek szinte teljes hiányával és a limfoid sejtek meghatározható kompartmentalizációja nélkül.

A nyiroktüszők hiánya felvetette a CXCL13 esetleges elégtelen termelődésének a lehetőségét, ezért ennek vizsgálatára a mutáns lépből készített metszeteket anti-CXCL13 és anti-CD21/35 (CR1.2 komplement receptorok) antitestekkel festettük. Bár a CD21/35-pozitív FDC csoportosulás a normál léphez képest jóval kompaktabb volt, a CXCL13 termelődés nem különbözött a normál léptől (**6.20. ábra**).



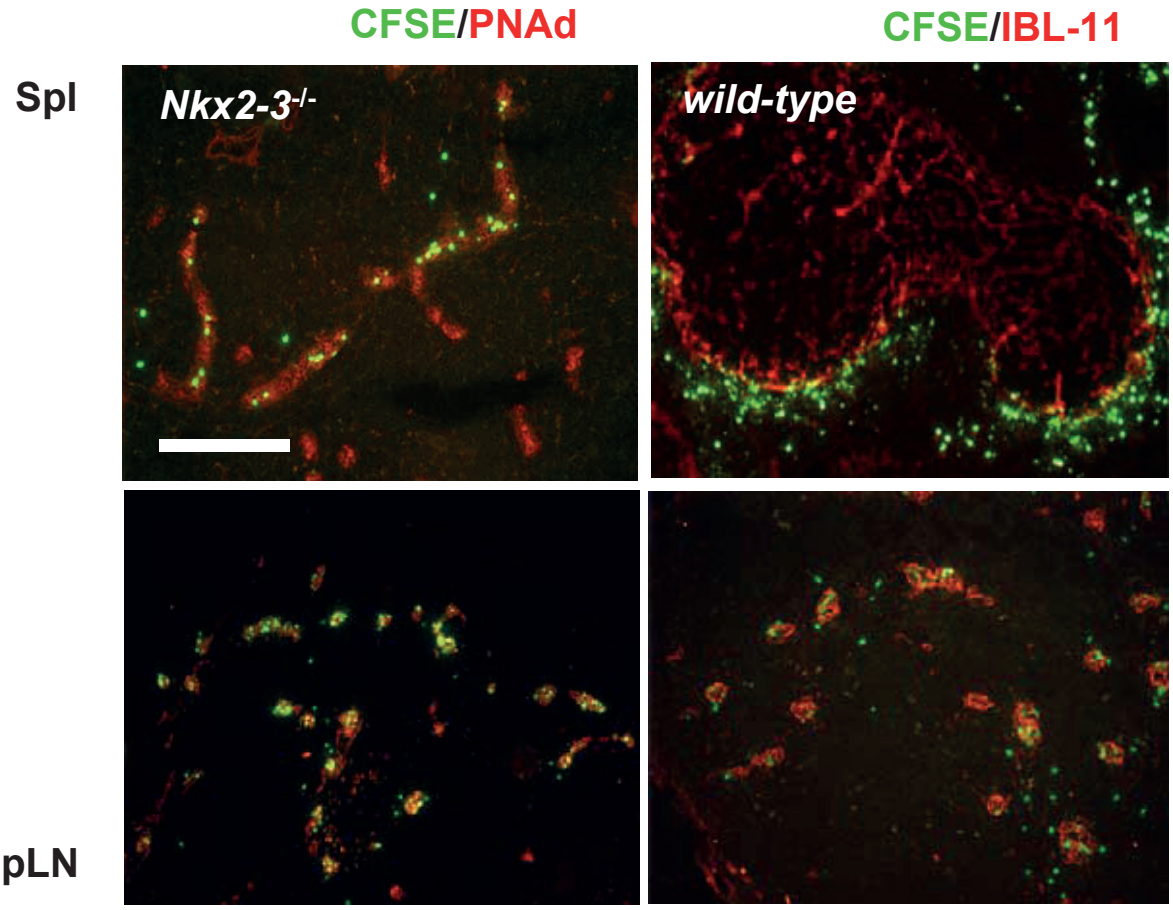
6.20. ábra: BALB/c egérben az Nkx2-3 hiánya *„redless”* variáns megjelenését okozza

(**A**) A „redless” variáns makroszkópos képe, a felső és középső mintán jól látható a normálhoz (alsó minta) képest kis méretű lép szélére szorult reziduális vörös pulpa, a felső mintán a nyíl a hilust mutatja (alsó minta vad típus). (**B**) Fagyasztott metszet Nkx2-3 mutáns és normál lépből anti-CD3 és anti-IgM immunhisztokémiai festéssel a T és B-sejtek feltüntetésére (Rp, vörös pulpa; Mz, marginális zóna; Fo, nyiroktüsző; PALS, periarterioláris limfoid hüvely), ami a mutánsokban a normál T:B elkülönülés helyett kevert megoszlást mutat. (**C**) Anti-CR1.2 és anti-CXCL13 kettős immunfluoreszcens jelöléssel az Nkx2-3-mutáns lépben (alsó sor) a normál léphez hasonló (felső sor) FDC jelenléte és CXCL13 kemokin termelése igazolható (n = 5, két független kísérletben. Lépték = 250 μm). *Czömpöly T, Lábadi 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 186:6981-9.*

6.7.3. A fehérvérsejtek megtelepedése az Nkx2-3$^{-/-}$ lépben a CCL21-termelő HEV-képletekben L-szelektin-függő módon történik

Kutatásunk következő szakaszában az Nkx2-3-mutáns lépekben megjelenő PNAd^{+} ereket mint lehetséges limfocita kilépési helyeket vizsgáltuk. Ehhez CFSE-jelölt limfocitákat oltottunk intravénásan, és a PNAd-pozitív erekhez való kapcsolódásukat vizsgáltuk kettős immunfluoreszcens eljárással. Röviddel az injektálásukat követően a jelölt limfocitákat a mutáns lépek PNAd^{+} HEV-jeivel szoros kapcsolódásban találtuk, míg normál lépben a CFSE-pozitív sejtek a MZ-ban helyezkedtek el. A mutáns lép a normálhoz viszonyítva jóval kevesebb CFSE-jelölt limfocitát tartalmazott, de a HEV-ben való előfordulásuk szinte megkülönböztethetetlen volt a nyirokcsomóktól (**6.21. ábra**).

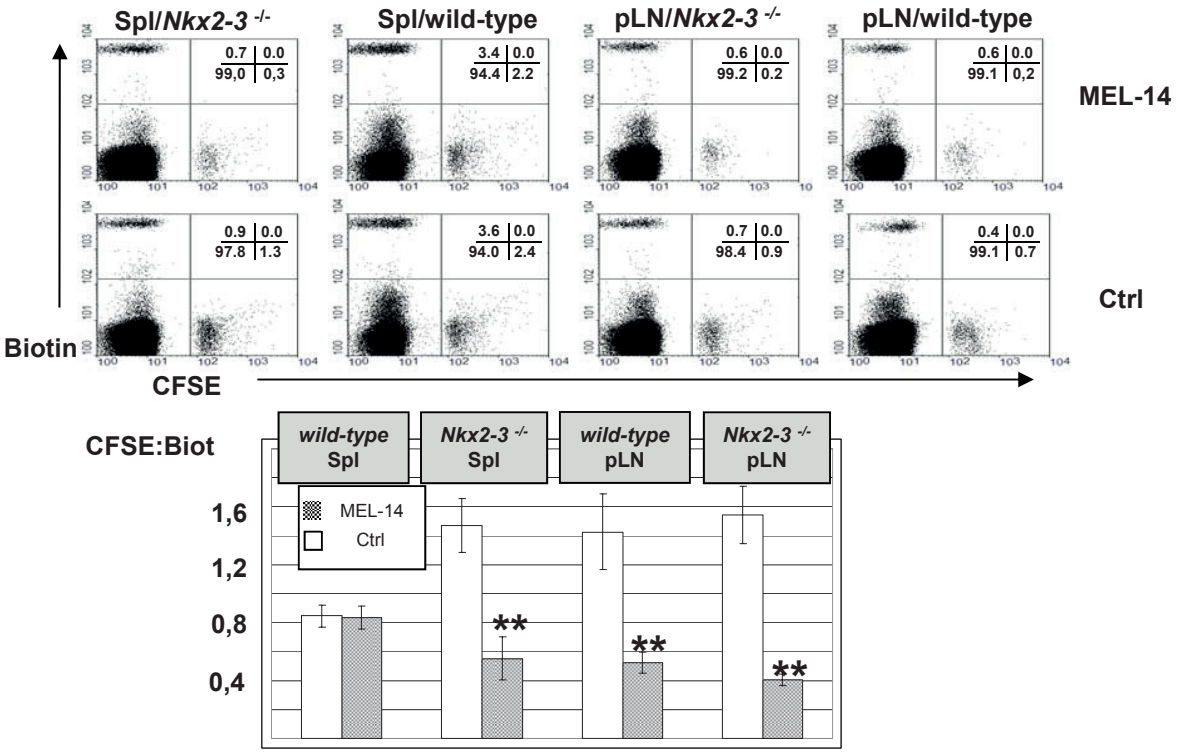
A limfociták kezdeti kapcsolódása a lép marginális szinuszát bélelő endotél sejtekhez L-szelektintől független folyamat (Nolte és mtsai, 2002), de a perifériás nyirocsomó HEV-kötődésében az L-szelektin elengedhetetlen. Az ektópiás PNAd^{+} HEV-ben történő limfocita-megtapadás L-szelektin függését rövid idejű kompetitív sejt-adhéziós kísérletekben vizsgáltuk, amiben



6.21. ábra: Az Nkx2-3$^{-/-}$ egerek lép HEV erei L-szelektin-függő kilépési kapuként működnek
A CFSE-jelölt limfociták 30 perccel az intravénás injekciót követően a MECA-79 antitesttel jelölt HEV-hez kötődnek a mutáns lépben és a nyirokcsomókban (pLN), normál egér lépben az IBL-11 antitesttel kimutatott marginális retikuláris sejtek környezetében rendeződnek el (lépték=200 μm, a képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják). *Czömpöly T, Lábadi 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 186:6981-9.*

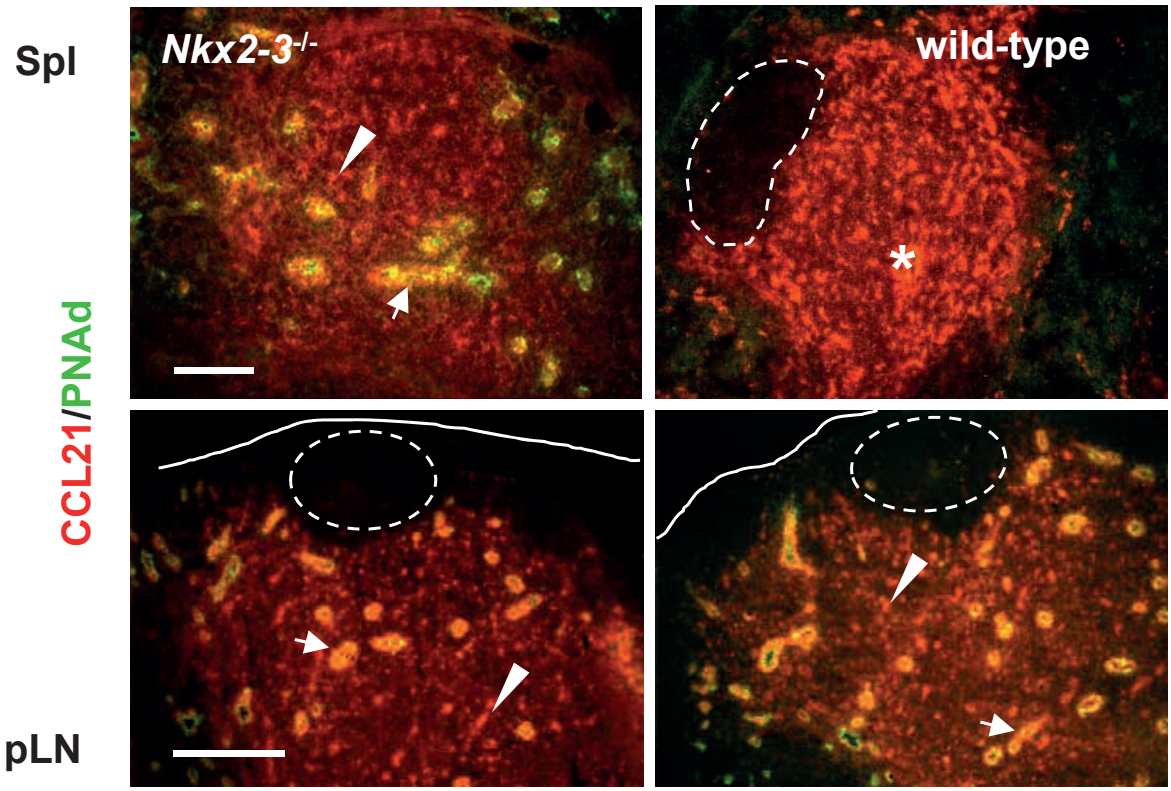
a limfociták L-szelektin molekuláját a MEL-14 monoklonális antitesttel blokkoltuk (Gallatin és mtsai, 1983). Ez az antitest megakadályozza a limfociták belépését a nyirokcsomóba *in vivo*, de nem eliminálja a sejteket (Link és mtsai, 2007). Azonos számú CFSE-jelölt és MEL-14 antitesttel kezelt limfocitát és kezeletlen biotinált sejtet (Nolte és mtsai, 2004) vénásan oltottunk vad típusú és Nkx2-3 mutáns recipiensekbe. Harminc perccel az oltás után a lépet és nyirokcsomókat áramlási citometriával vizsgáltuk, és a CFSE:biotinált sejt arány meghatározásával elemeztük az L-szelektin blokkolásának hatását. Eredményeink szerint a MEL-14 kezelés szignifikánsan csökkentette a CFSE:biotinált sejt arányt a mutáns lépben és a nyirokcsomókban, ugyanakkor a normál lépben nem befolyásolta (**6.22. ábra**). Ezek az eredmények igazolják, hogy a mutáns lépben az ektópiás PNAd-pozitív HEV-ek az L-szelektin kötődés révén vesznek részt a homingban.

Az L-szelektin PNAd-kötődését követően a nyirokcsomóba történő kilépés a HEV endotél által termelt CCL21 kemokin irányításával zajlik (Gunn és mtsai,1998). A mutáns lépek HEV endotél-sejtjeinek CCL21 termelését lép-metszetek kettős immunfluoreszcens festésével vizsgáltuk anti-CCL21 és MECA-79 antitestekkel. A nyirokcsomókhoz hasonlóan a mutáns lépek MECA-79-pozitív erei kifejezik a CCL21 kemokint, ami emellett a T-zóna FRC komponensein



6.22. ábra: A MEL-14 anti-L-szelektin antitest gátolja a rövid idejű migrációt Nkx2-3$^{-/-}$ egér lépében és nyirokcsomójában

CFSE-jelölt limfocitákat MEL-14 vagy kontroll patkány IgG-vel inkubáltunk, majd azonos mennyiségű biotinált sejttel együtt vénásan oltottunk normál vagy Nkx2-3$^{-/-}$ mutáns recipiensekbe. 30 perccel később kivett lép és nyirokcsomó (pLN) streptavidin-PE jelölése után a CFSE:biotin sejtarány alapján áramlási citometriával megállapítható a szövet-specifikus gátlás mértéke Nkx2-3$^{-/-}$ mutáns lépben és a nyirokcsomókban, normál lépben a MEL-14 kezelés nem okoz eltérést a CFSE:biotinált sejtarányban. A dot-plot ábrákon a számok az egyes kvadránsokhoz tartozó a limfocita kapun belüli sejtgyakoriságot mutatják. (Szürke oszlop, MEL-14 kezelés; fehér oszlop kontroll IgG, n=5, $^{**}p < 0{,}001$). *Czömpöly T, Lábadi 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 186:6981-9.*

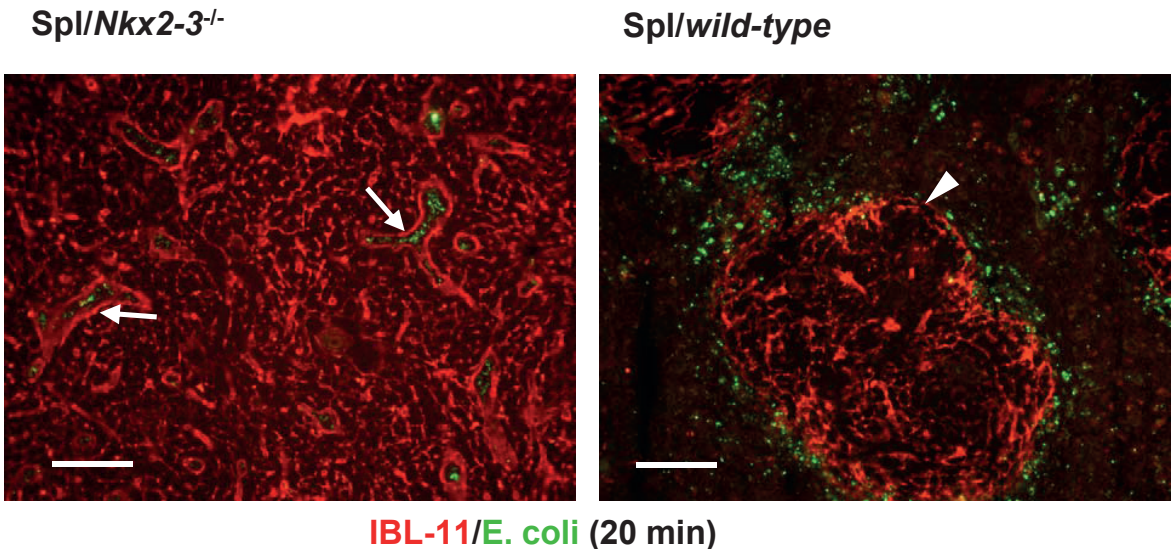


6.23. ábra: Az Nkx2-3$^{-/-}$ lép ektópiás HEV endotél sejtjeinek CCL21 kemokin termelése
A fibroblaszt sejtek (nyílhegyek) mellett a mutáns lép és a normál és mutáns nyirokcsomók (pLN) PNAd^{hi} HEV endotél sejtjei (nyilak) CCL21 kemokint termelnek, míg normál lépben (jobb felső kép) a CCL21 expresszió (PNAd festődés nélkül) a centrális arteriolát (csillag) körülvevő T-zóna fibroblaszt hálózatra korlátozódik. A szaggatott vonalak a nyiroktüszők helyét jelölik. (Lépték=200 μm; a képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják.) *Czömpöly T, Lábadi 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 186:6981-9.*

is kimutatható. A normál lépekben a CCL21 kifejeződés a centrális arteriolára és a T-sejt zóna FRC-re korlátozódott (**6.23. ábra**). Így az Nkx2-3 mutáns lépben az ektópiás PNAd^{+} ereken a CCL21 kemokin elérhető a limfociták számára.

6.7.4. A hematogén úton belépő kórokozók csökkent megkötése Nkx2-3$^{-/-}$ egerek lépében

A lép recirkuláció során a limfociták korai megtapadásában betöltött funkciója mellett a MZ fontos szerepet tölt be a vérpályán keresztül belépő kórokozók megkötésében is. Az érpálya kóros elrendeződése és a MZ hiánya felvetette a bakteriális kiszűrés hatékonyságának elemzését, amit fluoreszcein-jelölt E. coli intravénás oltásával vizsgáltunk (Guo és mtsai, 2007). A MZ makrofágok és a MAdCAM-1 hiánya miatt topográfiai markerként az IBL-11 antitestet használtuk, ami normál lépben MZ és T-sejt zóna kötőszöveti alapállományával, a mutánsokban a perivaszkuláris stromális sejtekkel reagál (Bovári és mtsai, 2007; Balogh és mtsai, 2007). A vad típusú állatok lépének MZ területén hatékony baktérium-kötődést találtunk, a mutáns lépben a baktériumok megtapadása nagymértékben csökkent (**6.24. ábra**). Ezek az eredmények a

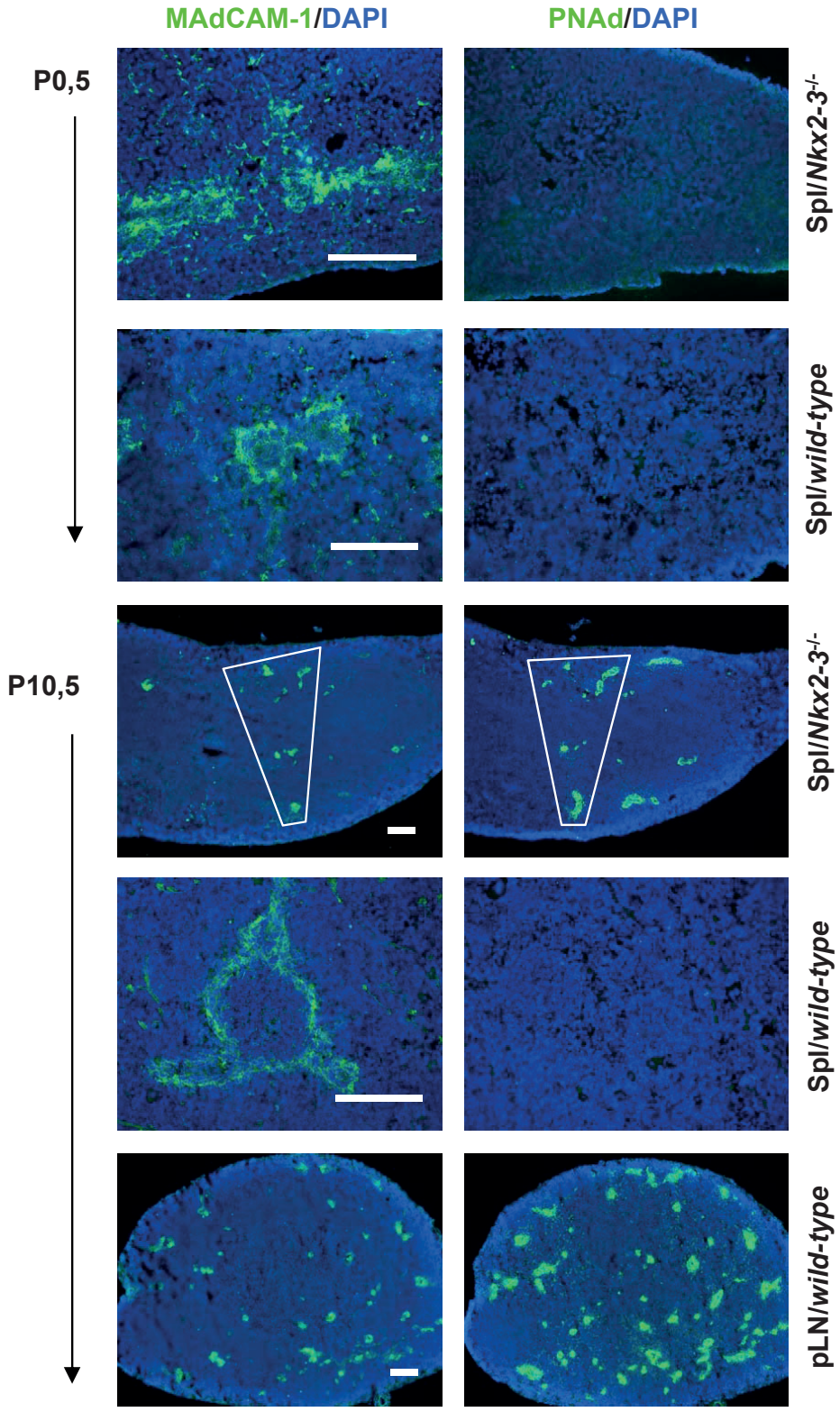


6.24. ábra: Csökkent hematogén baktérium-befogás Nkx2-3-mutáns egér lépében
FITC-jelölt E. coli (zöld) vénás beoltása után a mutáns lépekben csak intravaszkulárisan található kis mennyiségű jelölt baktérium (nyilak), normál egérben a baktériumok jelentékeny számban az IBL-11 antitest segítségével (vörös) azonosított marginális zónában halmozódnak fel (nyílhegy) (lépték=200 μm, a képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják). *Czömpöly T, Lábadi 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 186:6981-9.*

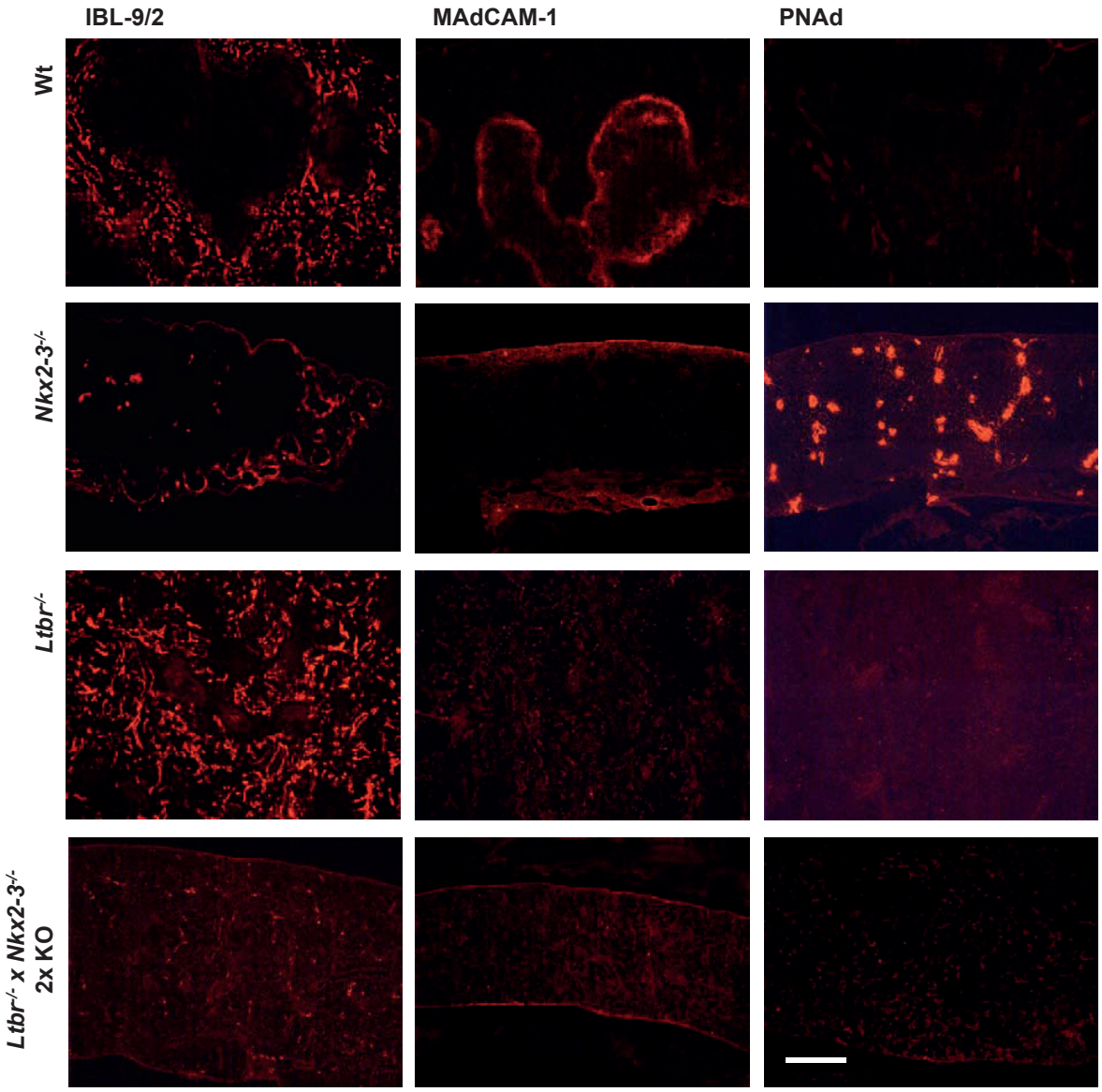
hematogén úton terjedő kórokozók megkötésének csökkenését igazolják az Nkx2-3 deficiens lépben a MZ makrofágok nagymértékű hiánya miatt.

6.7.5. Az Nkx2-3$^{-/-}$ lép ektópiás HEV-ek posztnatális fejlődése és LTβR függése

Bár felnőtt Nkx2-3-deficiens egérben a MAdCAM-1 hiányzik a szekunder nyirokszövetekben, korábbi adatok szerint újszülött mutáns egerek hasi nyirokcsomójában kimutatható (Pabst és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 2000). Normál fejlődéstani körülmények között a nyirokcsomók posztnatális érése során a MAdCAM-1 kifejeződése hasonló módon megszűnik a perifériás nyirokcsomók HEV-jein (Mebius és mtsai, 1996). Ugyanakkor krónikus fertőzések során a gyulladás helyén a tartós limfocita-infiltrációval együtt PNAd-pozitív HEV indukálható (Drayton és mtsai, 2003). Az újszülött mutáns lépekben a PNAd-pozitív HEV-ek megjelenésének vizsgálatával azt kívántuk meghatározni, hogy az ektópiás HEV-ek MAdCAM-1:PNAd váltásának a kinetikája a normál perifériás nyirokcsomóhoz hasonlít, vagy attól eltér. Immunfluoreszcens eljárással a két addresszin kifejeződésének mértékét vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a mutáns és vad típusú lép és fejlődő nyirokcsomó mintákon. 0,5 napos újszülöttekben a mutáns lép kevés MAdCAM-1 pozitív sejtcsoportot tartalmazott, PNAd-expresszió nélkül. A 10,5. napon a vad típushoz képest a mutáns lép sokkal kevesebb MAdCAM-1 jelölődést mutatott, melyek néhány PNAd-pozitív ér-képleten voltak kimutathatók, míg normál lépben a MAdCAM-1 a fokozatosan kialakuló marginális szinusz területében expresszálódott, PNAd festődés nélkül. A második posztnatális hét után a mutáns lépekben a normál nyirokcsomókhoz hasonlóan már nem volt kimutatható MAdCAM-1 reaktivitás, így ezek posztnatális addresszin-váltásának kinetikája megegyezőnek bizonyult (**6.25. ábra**).

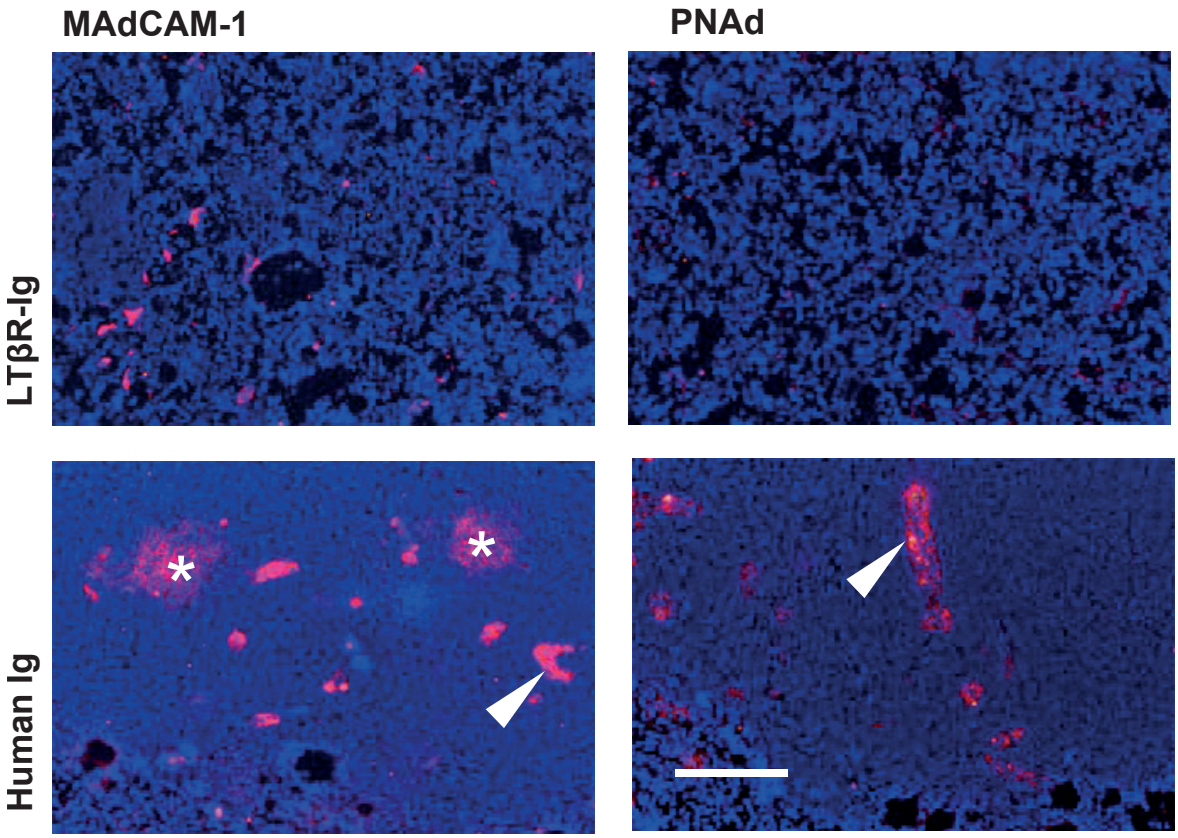


6.25. ábra: Az Nkx2-3 deficiens egerek ektópiás lép-HEV endotél sejtjeinek posztnatális addresszin-váltása
Újszülött (<P0,5) mutáns és normál egér lép-metszetek immunfluoreszcens festése a jelzett markerekre (zöld) DAPI magfestéssel (kék). A 10. posztnatális napra a mutáns egerekben a MAdCAM-1 expresszió a PNAd molekulát kifejező erekre korlátozódik (a jelzett négyszög azonos területet jelöl), a referenciaként használt azonos korú normál nyirokcsomónak (pLN) megfelelő mintázatban. (Lépték=50 μm, a képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják.) *Czömpöly T, Lábadi 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 186:6981-9.*



6.26. ábra: Az ektópiás PNAd-pozitív HEV-fejlődés Nkx2-3$^{-/-}$ lépben LTβR aktivitástól függ
Nkx2-3-mutáns, LTβR-mutáns és kombinált (*ltbr*$^{-/-}$ x *Nkx2-3*$^{-/-}$) mutáns és kontroll egér lép fagyasztott metszetek immunfluoreszcens festődése a jelölt antitestekkel. (Lépték=250 μm, a képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják.) *Czömpöly T, Lábadi 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 186:6981-9.*

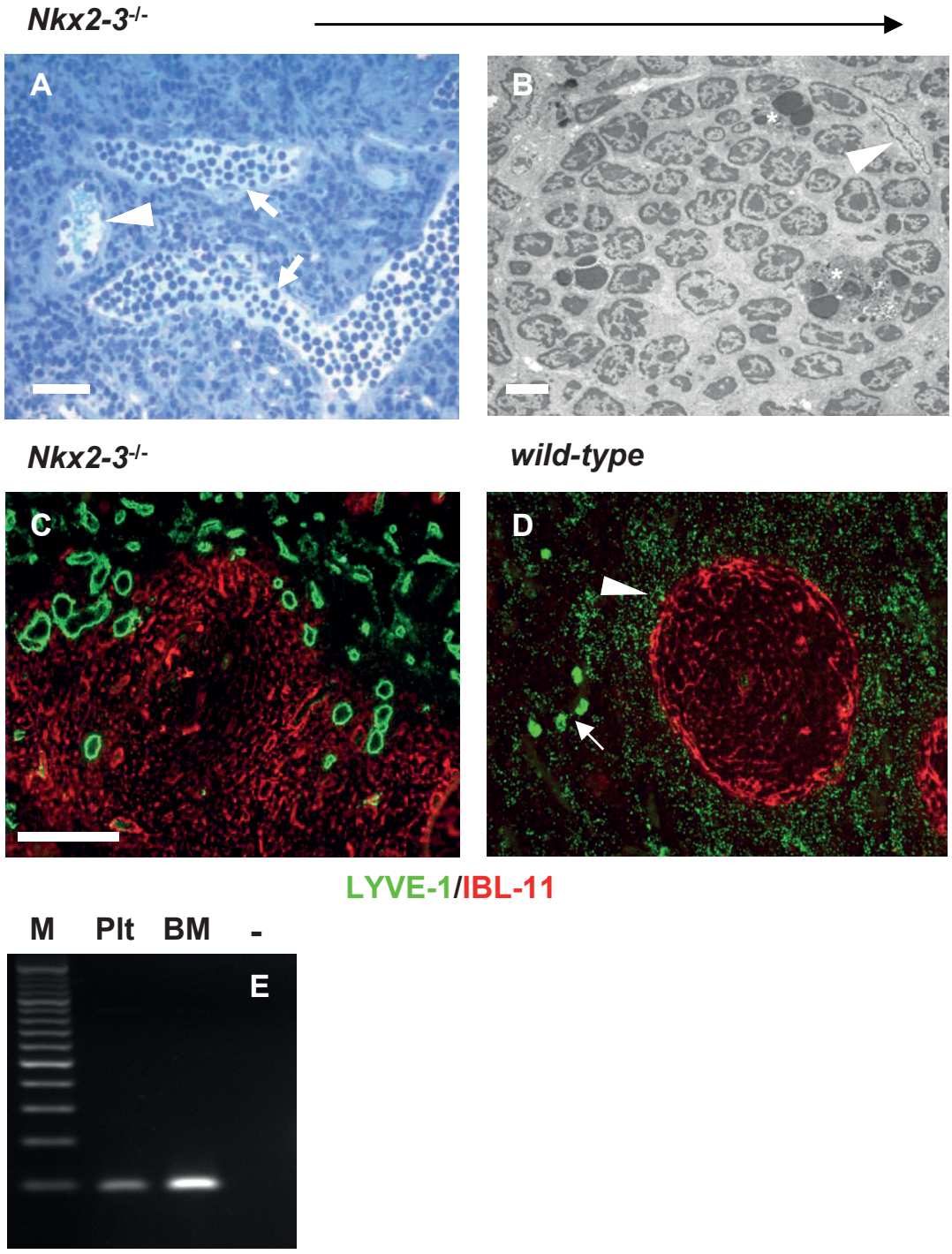
Az Nkx2-3 mutáns lépekben a perifériás nyirokcsomó HEV-szerű képletek nyirokcsomók erezetének differenciálódására emlékeztető fejlődése felvetette a lépet alkotó egyéb stromális elemek nyirokcsomó-jellegű fejlődésbiológiai mintázatváltásának a lehetőségét. Ennek legfontosabb jellemzője a LTβR szignalizációtól való függés (Drayton és mtsai, 2003; Browning és mtsai, 2005), ezért a mutáns lépben kialakuló HEV LTβR-függésének meghatározására kettősen mutáns egereket hoztunk létre. 4 hetes korban az *ltbr*$^{-/-}$ x *Nkx2-3*$^{-/-}$ kettősen mutáns egerek lépében sem MAdCAM-1, sem PNAd nem expresszálódott, és nem voltak HEV-szerű érelemek sem. A lép nem tartalmazott IBL-9/2-pozitív vörös pulpa érhálózatot, ami az Nkx2-3 mutációhoz hasonló jellemző, sem MAdCAM-1-pozitív marginális szinuszt (**6.26. ábra**). Ezen



6.27. ábra: Nkx2-3-deficiens egerek posztnatális kezelése szolúbilis LTβR-Ig fúziós fehérjével
Újszülött (<0,5P) és 3,5P napokon végzett LTβR-Ig kezelés (felső pár) nagymértékben gátolja a MAdCAM-1 kifejeződést és megakadályozza a PNAd-pozitív ektópiás HEV-képződést (felső sor, DAPI magfestés). A kontroll humán IgG-kezelt mintákban a HEV-ek mindkét addresszint kifejezik (nyílhegy), míg a MAdCAM-1 a stromális sejteken is megjelenik (csillagokkal jelölve). (Lépték=200 μm, a képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják.) *Czömpöly T, Lábadi 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 186:6981-9.*

eredmények szerint az Nkx2-3 hiányában megjelenő HEV-ek fejlődése a nyirokcsomóhoz hasonlóan LTβR-aktivációt igényel, ugyanakkor a lép mint önálló szerv megjelenését elősegítő mezenhímális elemek továbbra is a LTβR-tól függetlenül képesek a lép előtelepének kialakítására.

A lép nyirokcsomó-szerű érmintázatváltásának posztnatális LTβ függését LTβR-Ig fúziós fehérje 0,5. és 3,5. napon végzett oltásával vizsgáltuk, a mintákat a fenti posztnatális séma alapján a 10,5. napon vett lépminta PNAd és MAdCAM-1 immunhisztológiai vizsgálatával elemeztük. Eredményeink alapján a LTβR szolúbilis receptor-analóggal kiváltott posztnatális gátlása a PNAd-pozitív ektópiás HEV-szerű képletek számának szignifikáns csökkenésével járt (**6.27. ábra**). Ezek alapján az Nkx2-3 hiánya a helyi érképletek nyirokcsomó-szerű átprogramozásához vezet. Ugyanakkor az Nkx2-3 és LTβR kettős mutációját hordozó egerekben a lép önálló szervként megjelent, tehát az Nkx2-3 hiánya nem programozza át a teljes lép-előalak fejlődéstani mintázatát nyirokcsomó-előtelep típusúvá, amik nem fejlődnek ki LTβR-hiányos egerekben.



6.28. ábra: LYVE-1⁺ erek képződése Nkx2-3 hiányában

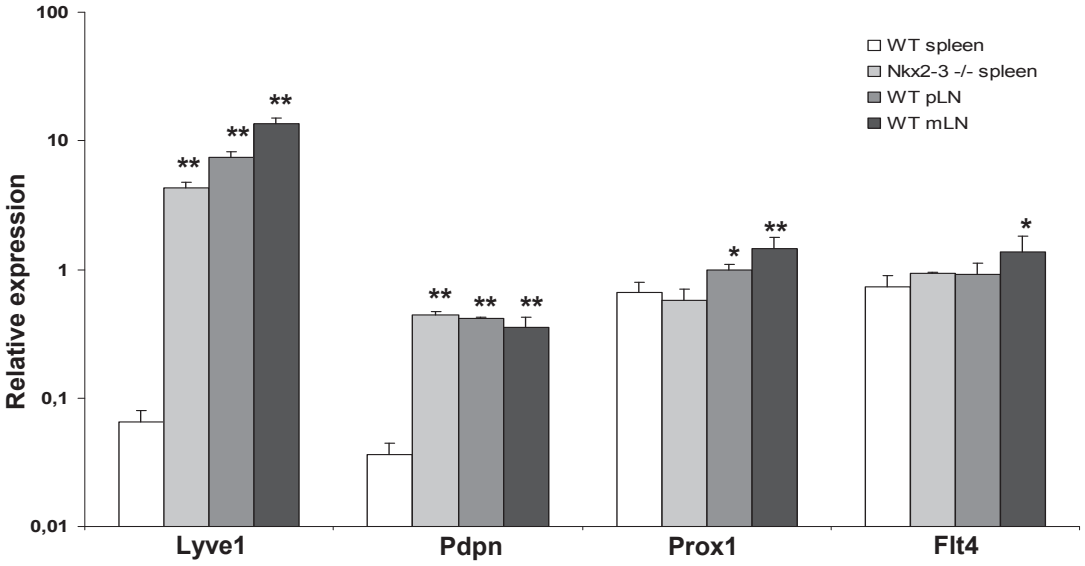
Toluidin kékkel festett félvékony metszeten (**A**) két, limfocitával kitöltött érszakasz (nyilak) és egy kapilláris (nyílhegy) figyelhető meg (Lépték = 50 μm). Transzmissziós elektron mikroszkópos felvételen (**B**) a tasak-szerű képletet szorosan kitöltő limfoid sejtek láthatók, belső kötőszöveti szerkezet nélkül, amit kívülről lapos sejtmagot tartalmazó elongált sejtek határolnak (nyílhegy) (Lépték=7,5 μm). A LYVE-1-pozitív struktúrák (zöld) az Nkx2-3 mutáns lépekben elsősorban a széli részen halmozódnak fel (**C**), amiket nem határol IBL-11-pozitív fibroblasztos hüvely (vörös) (Lépték= 200 μm). Normál egérben a LYVE-1 (**D**) expresszió az IBL-11-pozitív (vörös) marginális zónában a trombocitákon (nyílhegy) és a megakariocitákon (nyíl) figyelhető meg. Egér vérlemezke-sűrítmény (Plt) és csontvelő (BM) mintákban (**E**) reverz transzkriptáz PCR eljárással kimutatható a Lyve1 mRNS kifejeződése (nukleáz-mentes víz kontroll, M: 100 bp standard létra). *Kellermayer Z, Lábadi A, Czömpöly 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.*

6.7.6. LYVE-1⁺ endotél tasakok képződése Nkx2-3-hiányos egér lépében

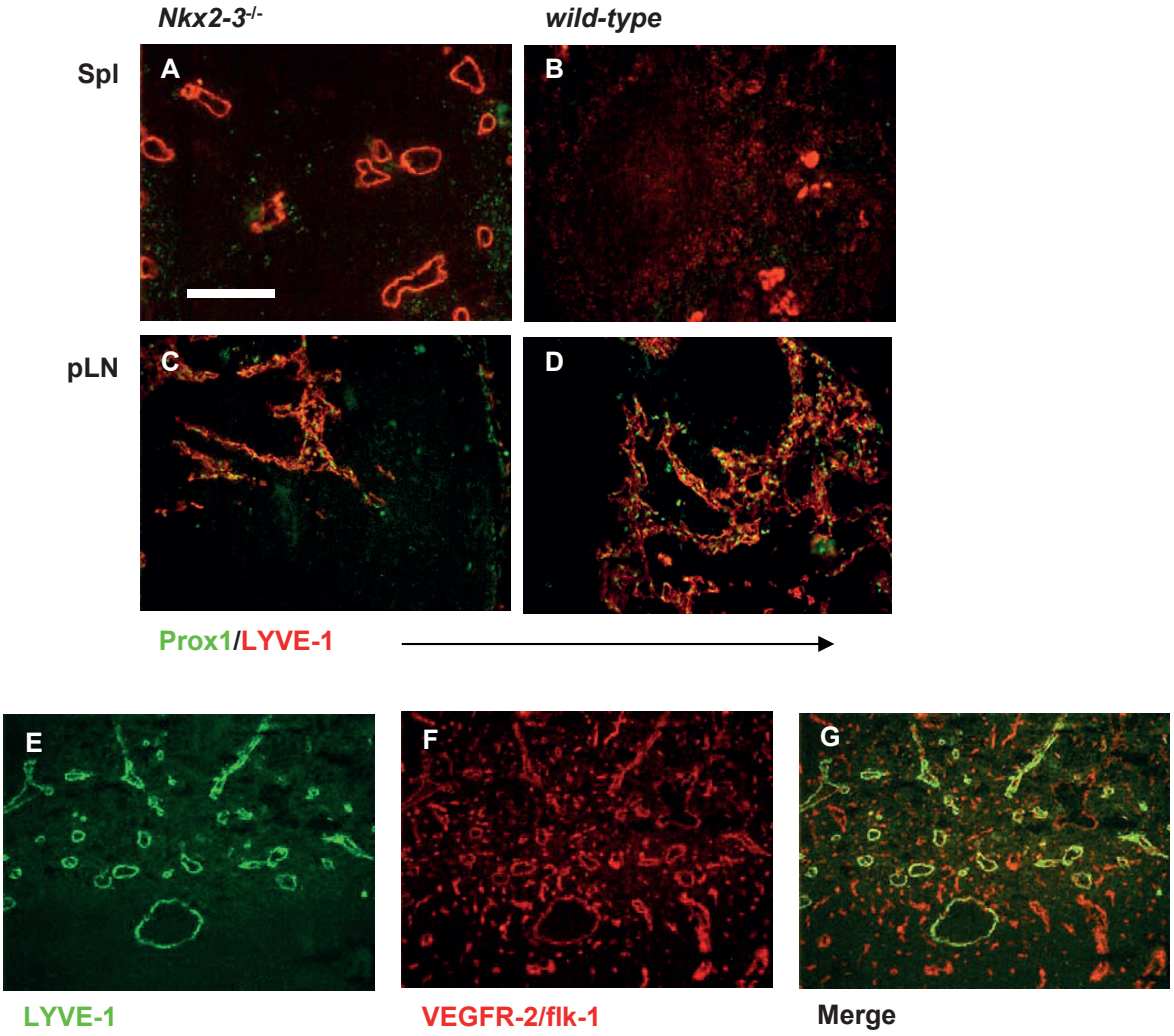
Az Nkx2-3 hiányában kialakuló lép érszerkezeti vizsgálataink (Balogh és mtsai, 2007) folytatása során a mutáns lépekben lelapult sejtekkel határolt, limfocitákkal töltött tasakokat figyeltünk meg, főként a lép perifériás részében. A PNAd-pozitív ektópiás HEV jelenléte a lépben (Czömpöly és mtsai, 2011), valamint további szövettani és elektronmikroszkópos vizsgálatok felvetették, hogy ezek a tasak-szerű képletek esetleg aberráns ektópiás nyirokkapillárisok lehetnek (Kellermayer és mtsai, 2011). A nyirokendotél sejtek (LEC) vizsgálata során gyakran alkalmazott LYVE-1 (Prevo mtsai, 2001) ezekkel a képletekkel intenzív festődést mutatott, míg vad-típusú lépben a LYVE-1 reaktivitás a vörös pulpa megakariocitákra és vérlemezkékre korlátozódott **(6.28. ábra)**, amit a LYVE-1 mRNS kifejeződése is alátámaszt trombocita-dús plazma és csontvelő mintákban.

6.7.7. A nyirokendotél-asszociált mRNS megosztott kifejeződése

A LYVE-1-pozitív tasakokat bélelő sejtek LEC-identitásának további igazolására a LEC differenciálódásához kapcsolódó szignatúra-gének (Kaipanen és mtsai, 1995; Breiteneder-Geleff és mtsai, 1999; Wigle és Oliver 1999) mRNS kifejeződését vizsgáltuk a lépmintákból készített cDNS qPCR elemzésével. Vad típusú egerek lépéhez viszonyítva a LYVE-1 mRNS (66,8-szeres) és podoplanin (12,1-szeres) jelentékeny emelkedést mutatott, míg a Prox1 és Flt4/VEGFR-3) mRNS szintek nem különböztek a vad típusú és a mutáns lépek között (**6.29. ábra**).

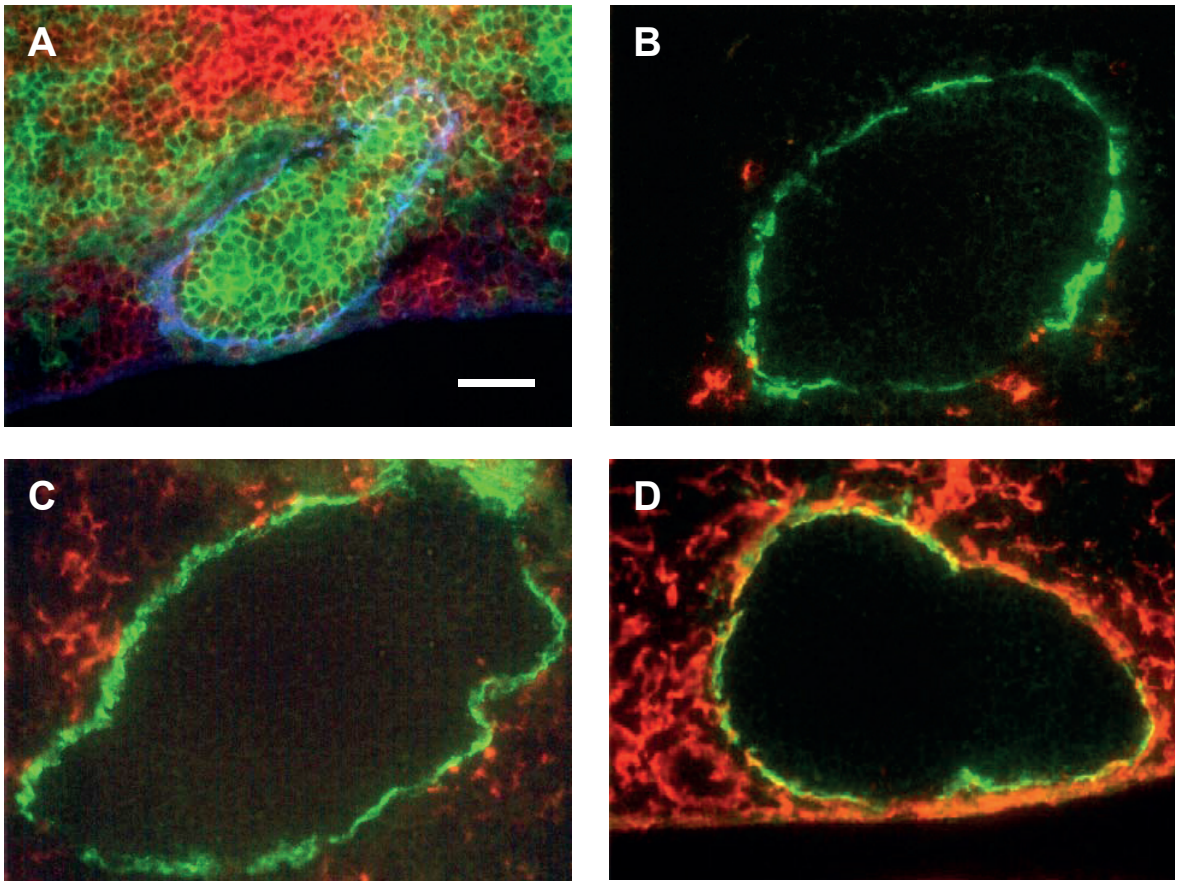


6.29. ábra: Nyirokendotél-asszociált gének mRNS expressziójának vizsgálata qPCR analízissel
Az egyes célgén mRNS kifejeződését normál (Wt) és Nkx2-3 mutáns lép, normál perifériás nyirokcsomó (pLN) és hasi nyirokcsomó (mLN) mintákon az adott gének β-aktinhoz való normalizálásával vizsgáltuk. Az oszlopdiagram három egér hat párhuzamos mintájának átlagát ± SD értékekkel mutatja. *$p < 0,05$; **$p < 0,001$. *Kellermayer Z, Lábadi A, Czömpöly 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.*



6.30. ábra: A LYVE-1⁺ struktúrák non-limfoid endotél jellemzői
Az Nkx2-3-mutáns lépben (**A**) a LYVE-1⁺ képletek (vörös) nem tartalmaznak immunhisztológiailag detektálható mennyiségben a limfatikus endotél elköteleződéshez szükséges Prox-1 fehérjét. Normál lépben a LYVE-1 (**B**) a vörös pulpa makrofágokban és a vérlemezkékben mutatható ki. Nkx2-3 mutáns és normál perifériás nyirokcsomóban (pLN) a Prox-1 transzkripciós faktor (**C/D**) nukleáris jelölésként (zöld) kimutatható a LYVE-1⁺ medulláris nyirokerekben (vörös).
A Prox-1 hiánya mellett a LYVE-1⁺ struktúrák (zöld) hordozzák a VEGFR-2/flk-1 markert (vörös), megerősítve ezen sejtek endotél-eredetét (**E/G**). (A képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják, lépték = 200 μm.) *Kellermayer Z, Lábadi A, Czömpöly 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.*

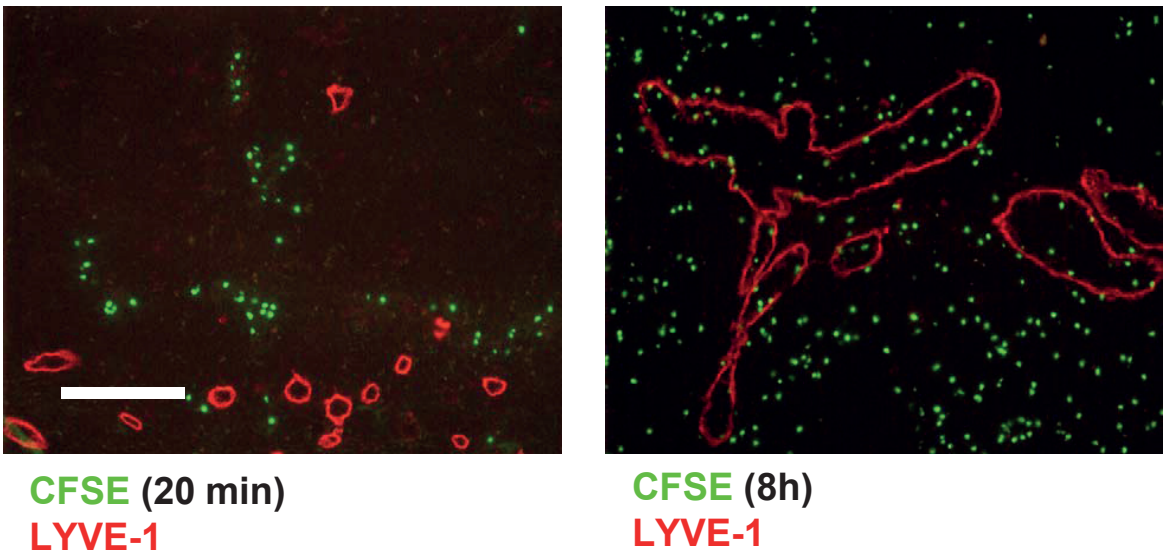
A Prox1 és LYVE-1 kettős immunfluoreszcens jelöléssel átfedő reaktivitást mutatott a nyirokcsomó nyirokerein, míg az Nkx2-3 mutáns lépekben nem volt immunhisztokémiailag detektálható mennyiségű Prox1 protein, alátámasztva a Prox1 mRNS qPCR eredményeket. Ugyanakkor a VEGFR-2/flk-1 és LYVE-1 koexpressziója ezen képletek endoteliális (bár nem LEC) eredetére utal (**6.30. ábra**).



6.31. ábra: A LYVE-1⁺ struktúrák külső és belső szerkezete
A LYVE-1⁺ tasakokban (kék) elsősorban T-sejtek (zöld) találhatók, kisebb részben B-sejtek (vörös) mutatkoznak (**A**). A lép marginális zóna (**B**) külső rétegére jellemző MARCO-pozitív makrofágok (vörös) egyesével vagy elszórt kis csoportokat képezve helyezkednek el a LYVE-1⁺ (zöld) rétegen kívül. Hasonló megoszlásban szialoadhezin-pozitív makrofágok (vörös) is kimutathatók (**C**). A LYVE-1⁺ területen (zöld) kívül a fibroblasztokra jellemző ER-RT7⁺ (vörös) hálózat található (**D**), míg a belsejében nincs festődés, a képletek tasak vagy ciszta jellegére utalva. (A képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják, lépték= 100 μm.) *Kellermayer Z, Lábadi A, Czömpöly 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.*

6.7.8. A LYVE-1⁺ tasakok limfocita-tartalma és stromális mikrokörnyezete

A LYVE-1⁺ tasakokban felgyülemlett limfociták összetételének és esetleges irányított elrendeződésének meghatározására a mutáns lépeket T- és B-sejtes markerekre specifikus antitestekkel vizsgáltuk. A tasakokat körülvevő mezenhímális stróma elrendeződését fibroblaszt-specifikus antitestekkel és a lép rezidens makrofágjait felismerő ellenanyagokkal elemeztük. A tasakokban lévő sejtek túlnyomó része T-sejt, körülötte kisebb csoportosulásokban MARCO és Sn/CD169-pozitív MZ makrofágokat detektáltunk. A LYVE-1⁺ határréteget ER-TR7⁺ FRC sejtek veszik körül, ugyanakkor a tasakokon belül nem volt semmiféle FRC-reaktív jelölődés, ami megerősíti a képletek ciszta-szerű szerkezetét (**6.31. ábra**).



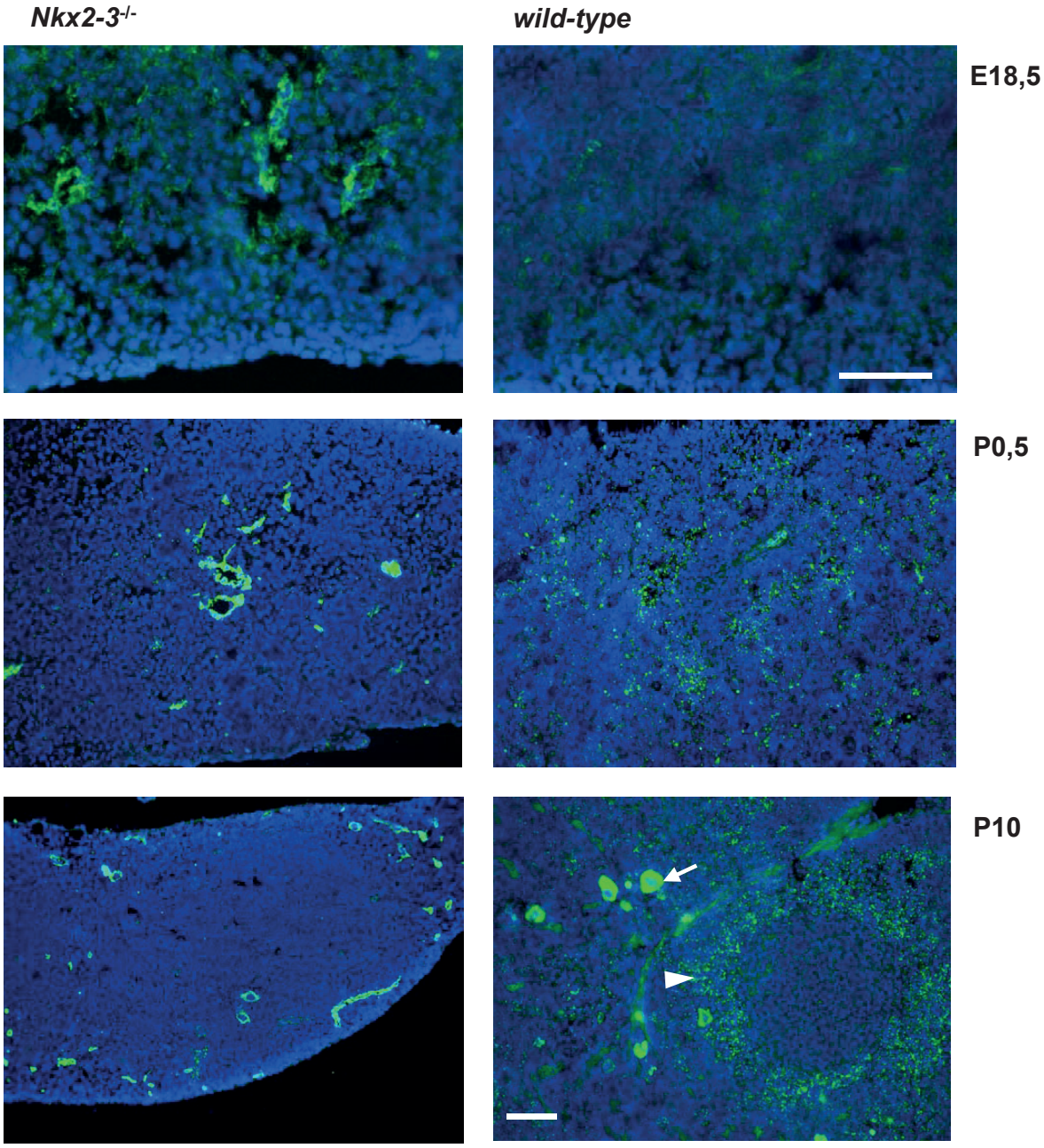
6.32. ábra: A LYVE-1⁺ tasakok elkülönülése a vérkeringéstől
CFSE-jelölt limfociták (zöld) 20 perccel a vénás injektálás után túlnyomórészt a LYVE-1⁺ (vörös) struktúrákon kívül helyezkednek el (bal), és 8 óra elteltével is csak kis részben jutnak el a belsejükbe (jobb). (A képek három különböző alkalommal öt egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják, lépték= 200 μm.) *Kellermayer Z, Lábadi A, Czömpöly 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.*

6.7.9. A LYVE-1⁺ tasakok korlátozott limfocita-felvétele

A keringő limfociták LYVE-1⁺ tasakokba való belépésének vizsgálatára adoptív sejt-transzfer kísérleteket végeztünk. Ennek során CFSE-jelölt lépsejteket oltottunk vénásan, majd különböző időpontban meghatároztuk a LYVE-1⁺ tasakokban való megjelenésüket. Az oltást követő 20 perc után csak elenyésző mennyiségű CFSE-pozitív sejtet találtunk, amik az összes lépbe jutó sejt kb. 2%-át teszik ki, ugyanakkor ez a gyakoriság 8 óra múlva kb. 12%-ra emelkedik egy 1,4 mm^2 méretű lép-területen (**6.32. ábra**). A vörösvértestek hiányával együtt ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a tasakok nem állnak közvetlen kapcsolatban az érpályával, de ennek ellenére a limfoid sejtek bejutnak ezekbe a képletekbe.

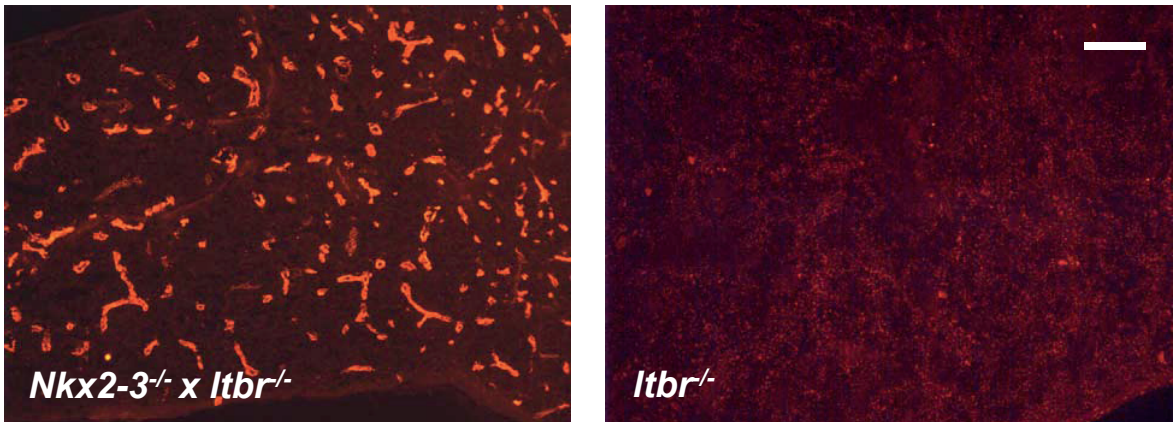
6.7.10. A LYVE-1⁺ tasakok fejlődése az embrionális fejlődés során kezdődik, és nem igényel LTβR aktivációt

A felnőtt LEC mellett az embrionális vérereket bélelő endotél is kifejezi a LYVE-1 glikoproteint (Gordon és mtsai, 2008). Az embrionális lépben fejlődő erek LYVE-1 kifejeződésének vizsgálatára 18,5 embrionális napos és korai posztnatális (0,5 nap) korú vad típusú és Nkx2-3-hiányos egerek lépén is immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Bár az Nkx2-3 hiányos lépben LYVE-1-pozitív sejt-csoportosulásokat azonosítottunk, ezek nem alkottak a felnőtthöz hasonló tasakokat, míg vad típusú egerekben nem voltak hasonló struktúrák (**6.33. ábra**).



6.33. ábra:A LYVE-1⁺ képletek posztnatális kialakulása

A képek a késő embrionális (E18,5), újszülött (P0,5) és 10 napos Nkx2-3 deficiens és kontroll lépminták LYVE-1⁺ sejtjeinek elrendeződését mutatják immunfluoreszcens jelöléssel (zöld) és DAPI magfestéssel. A bal oldali mutáns oszlopban a 10. napra a felnőttre jellemző képletek alakulnak ki, a kontroll mintában (jobb oldal) a vörös pulpa megakariociták (nyíl) és a fejlődő marginális zónában felhalmozódó trombociták (nyílhegy) jelölődnek. (A képek három különböző alkalommal három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják, lépték= 100μm.) *Kellermayer Z, Lábadi A, Czömpöly 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.*



6.34. ábra: A LTβR szerepe a LYVE-1⁺ struktúrák megjelenésében Nkx2-3$^{-/-}$ lépben
A LTβR és Nkx2-3 kettős mutációját hordozó állat lépében (bal) a LYVE-1⁺ kapillárisok (vörös) fokozott mértékben jelennek meg, LTβR hiányában (jobb) a lépben a trombocita-reaktivitás a jellemző. (A kép mintánként öt egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét mutatja, lépték= 100 µm.) *Kellermayer Z, Lábadi A, Czömpöly 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.*

A LTβR fokozza a limfangiogén VEGFR-3 receptorhoz kötődő VEGF-C ligand termelődését, ezáltal elősegítve a nyirokkapillárisok dúsulását (Vondenhoff és mtsai, 2009). A LYVE-1⁺ tasakok fejlődésének LTβR aktivitástól való függését kettősen mutáns egerek kialakításával vizsgáltuk. Eredményeink szerint a LYVE-1-pozitív tasakok kimutathatóak a kettősen mutáns egerek lépében, így képződésük független a LTβR által közvetített szignáloktól (**6.34. ábra**).

Összefoglalóan az Nkx2-3-hiányos egerek lépe az érpálya-szerveződés zavarai mellett LYVE-1⁺ tasakszerű képleteket is tartalmaz, amik részleges LEC-fenotípust és génexpressziós tulajdonságokat hordoznak. Sejt-transzfer kísérletek alapján ezen sejtek nem kapcsolódnak közvetlenül a vérkeringéshez, bár hozzáférhetőek a lépbe jutó limfociták számára. Ezeknek a struktúráknak a képződése független a LTβR aktivitásától, és feltehetőleg abortív limfatikus vagy embrionális ér-maradványokat reprezentálhatnak az Nkx2-3 hiányos lépben (Kellermayer és mtsai, 2011).

6.8. Az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor hiánya átprogramozza a Peyer-plakkok limfocita homingban résztvevő endoteliális addresszin preferenciáját

Korábbi kutatások feltárták az Nkx2-3 transzkripciós faktornak a MAdCAM-1 addresszin endoteliális expressziójának szabályozása révén a lép és Peyer-plakkok (PP) fejlődésében játszott fontos szerepét. Az Nkx2-3 mRNS kimutatható a PP és hasi nyirokcsomók HEV sejtjeiben (Lee és mtsai, 2014), így feltehetőleg közvetlenül ezekre a sejtekre korlátozódóan fejti ki a MAdCAM-1 kifejeződésben betöltött hatását, de az egyéb (stromális és hámsejteken keresztüli) módosító hatást sem lehet bizonyossággal kizárni. Az Nkx2-3 deficiens egereken végzett korábbi munkánk a lép érpálya-mintázatnak nyirokcsomó típusú mintázatra történő átváltását igazolta, ami az L-szelektin közvetítette homingot fenntartó PNAd-pozitív ektópiás HEV-fejlődésében és a LYVE-1 nyirokendotél-markert hordozó tasakok megjelenésében nyilvánul meg (Czömpöly és mtsai, 2011; Kellermayer és mtsai, 2011).

A lép érpálya-eltérései mellett az Nkx2-3 hiányos egerekben a PP és hasi nyirokcsomó HEV endotél-sejtjein hiányzik a MAdCAM-1 (Pabst és mtsai, 1999; Wang és mtsai, 2000). A PP-ba történő limfocita hominghoz a MAdCAM-1 HEV-en történő kifejeződésére van szükség, így a MAdCAM-1 hiányában a mutáns PP HEV-ben egy alternatív adhéziós folyamattal járó homing történhet, ami a mutáns PP kisebb mérete alapján feltehetőleg kevésbé hatékony. Az Nkx2-3 mutáns PP-ban a MAdCAM-1 hiányban kialakuló alternatív homing folyamatának molekuláris komponenseit eddig nem azonosították.

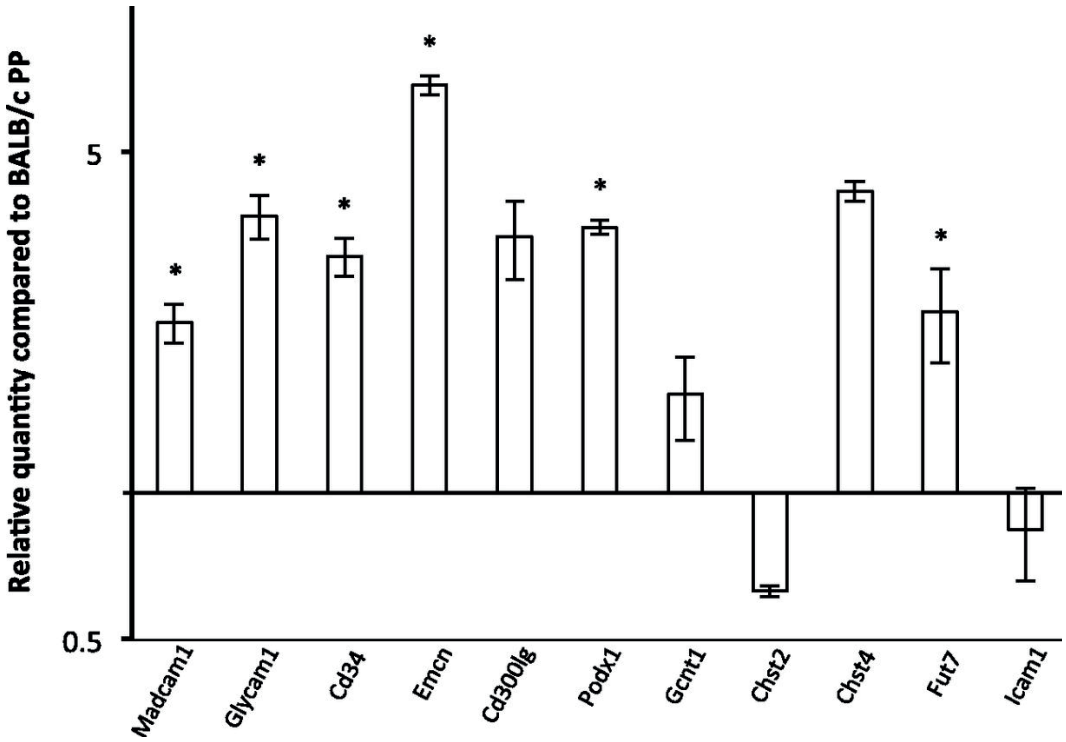
Az Nkx2-3 által szabályozott gén-kifejeződés további jelentősége a krónikus gyulladással járó Crohn-betegség és colitis ulcerosa, ahol az Nkx2-3 kifejeződésének autoantitest-termelődéssel és nagymértékű limfocitás bél-infiltrációval együttjáró megváltozását és számos szekvencia-variáns meglétét igazolták (Parkes és mtsai, 2007; Fisher és mtsai, 2008). Így az Nkx2-3 hiányában a MAdCAM-1-től független mukózális homing jelensége egyrészt felhívja a figyelmet az endotél sejtek addresszin-expresszió eltéréseiben megnyilvánuló plaszticitására, másrészt figyelmeztet a gyulladásos bélbetegségekben egyre szélesebben alkalmazott addresszin/integrin-specifikus immunterápiák lehetséges korlátaira.

Ezek a megfigyelések és eredmények szükségessé tették az Nkx2-3 hiányos egér PP addresszin mintázatára és homing folyamatára irányuló részletes vizsgálatokat. Eredményeink szerint a mutáns PP HEV endotél sejteken a MAdCAM-1 helyét túlnyomórészt a PNAd veszi át, ami a posztnatális nyirokcsomó HEV-differenciálódásának folyamatára emlékeztetően zajlik. Ezek a megfigyelések alátámasztják azt az elképzelést, ami szerint az Nkx2-3 szerepe a nyirokcsomó-szerű érmintázat-kialakulás represszor szabályozása a lépben és a bél-asszociált nyirokszövetekben. Így a nyálkahártya PNAd expressziójának fokozása révén a HEV endotél sejtek mellett képesek a HEV funkció megőrzésére (Kellermayer és mtsai, 2014).

6.8.1. A HEV-re jellemző gének mRNS kifejeződésének nyirokcsomó-szerű mintázatváltása Nkx2-3-hiányos felnőtt egerekben

Az endoteliális MAdCAM-1 expresszió nem akadályozza meg az Nkx2-3-hiányos egerekben a PP kialakulását és a limfociták helyi akkumulálódását. Korábbi munkánk során igazoltuk a mutáns lépekben PNAd-pozitív ektópiás HEV megjelenését (Czömpöly és mtsai, 2011), ezért feltételeztük, hogy ehhez hasonló módon a PP HEV endotél sejtjein is a PNAd helyettesíti a MAdCAM-1 addresszint.

A lehetséges PNAd váz-fehérjék közé tartozik a GlyCAM-1, CD34, podocalyxin, endomucin, nepmucin és MAdCAM-1, amelyek számos fukozil-transzferáz és szulfo-transzferáz által katalizált szializálódás, fukozilálódás és szulfatálódás révén válnak alkalmassá az L-szelektin általi felismerésre. Ezeknek a célgéneknek a mRNS kifejeződését qPCR eljárással vizsgáltuk, vad típusú egerekhez hasonlítva. Eredményeink alapján a váz-fehérjék mRNS szintje eltérő módon változik, közülük az endomucin mutatta a legnagyobb mértékű emelkedést. Meglepő módon a Madcam1 mRNS szintje is emelkedett a mutáns PP-ban, az endoteliális MAdCAM-1 glikoprotein hiánya ellenére.



6.35. ábra: PNAd vázfehérjék és glikozilációs enzimek mRNS expressziójának fokozódása Nkx2-3$^{-/-}$ egerek PP mintáiban

Kontroll egerekhez hasonlítva az Nkx2-3 hiányos egerek PP mintáiban qPCR eljárással szignifikánsan fokozódott PNAd vázfehérje (Glycam1, Cd34, endomucin, podocalyxin-szerű protein), és változóan emelkedett glikozilációs enzim mRNS expresszió igazolható. Az y_{log} egyes értékei a normál minták cél-mRNS:β-aktin arányával korrigált ± SEM adatokat mutatják, amit az y=1 értéknél húzott vízszintes vonal jelez ($n \geq 3$ állat *$p < 0{,}05$). *Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O'Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, Balogh P. 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.*

A modifikáló enzimek vizsgálata során is jellegzetes különbségeket találtunk. A Gcnt1 glikoziltranszferáz nem változott szignifikánsan, míg a két szulfotranszferáz közül a Chst2 mRNS csökkent, ugyanakkor a MECA-79 szulfoepitóp képződéséért felelős Chst4 4-szeres emelkedést mutatott. A vad típushoz hasonlítva a mutáns PP-ban a Fut7 fukozil-transzferáz mRNS szintén fokozottan expresszálódott (**6. 35. ábra**).

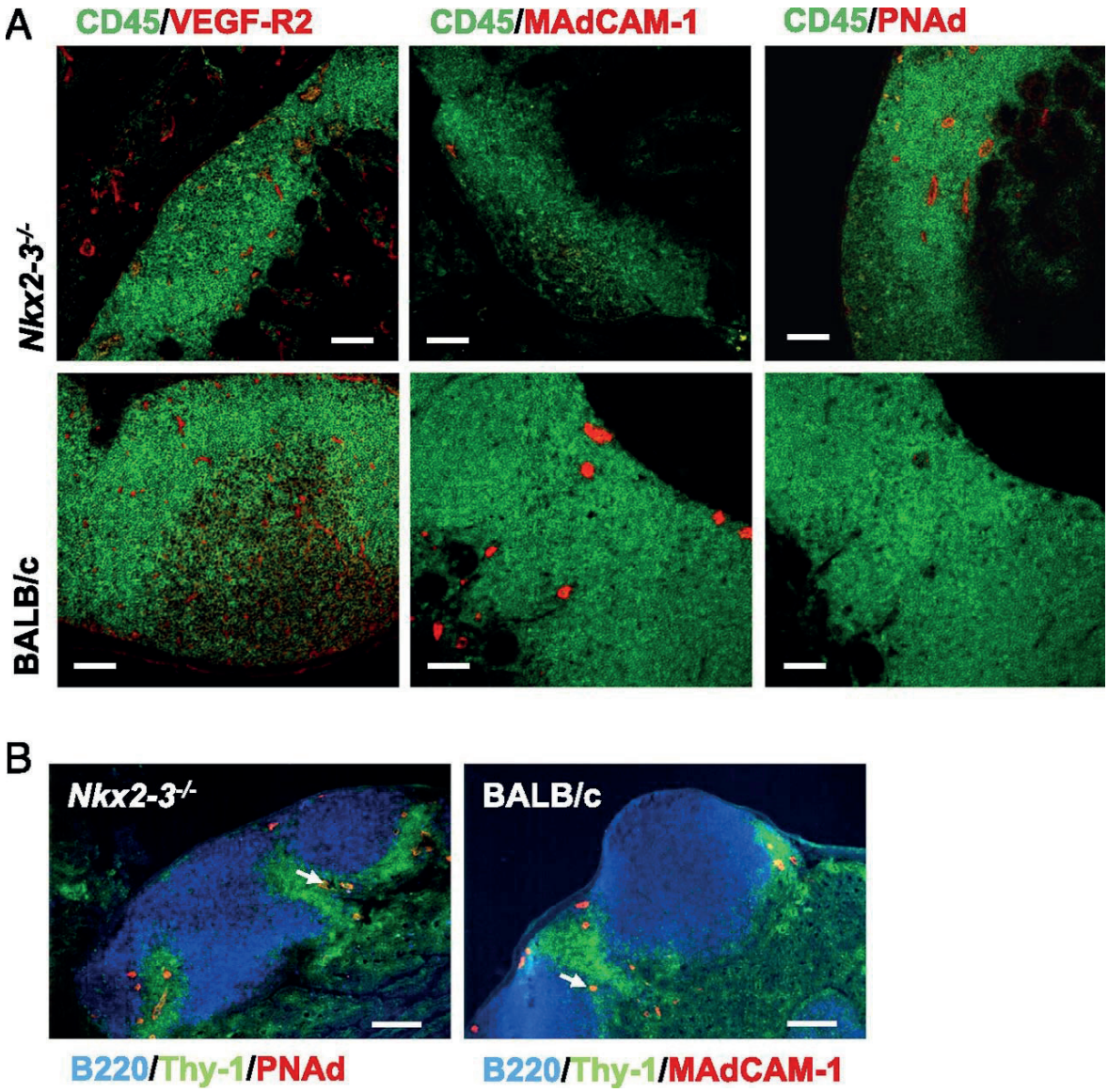
Összefoglalóan ezek az eltérések az Nkx2-3 PP ér-pályáinak perifériás nyirokcsomó-szerű mintázatváltását jelzik, ami a mutáns lépben is megfigyelhető. A lépben lezajló ektópiás HEV-képződéssel szemben azonban ez a jelenség a PP-ban egy már meglévő HEV variációnak tekinthető.

6.8.2. A bél-asszociált nyirokszövetek HEV endotél és limfocita összetétel vizsgálata Nkx2-3 deficiens egérben

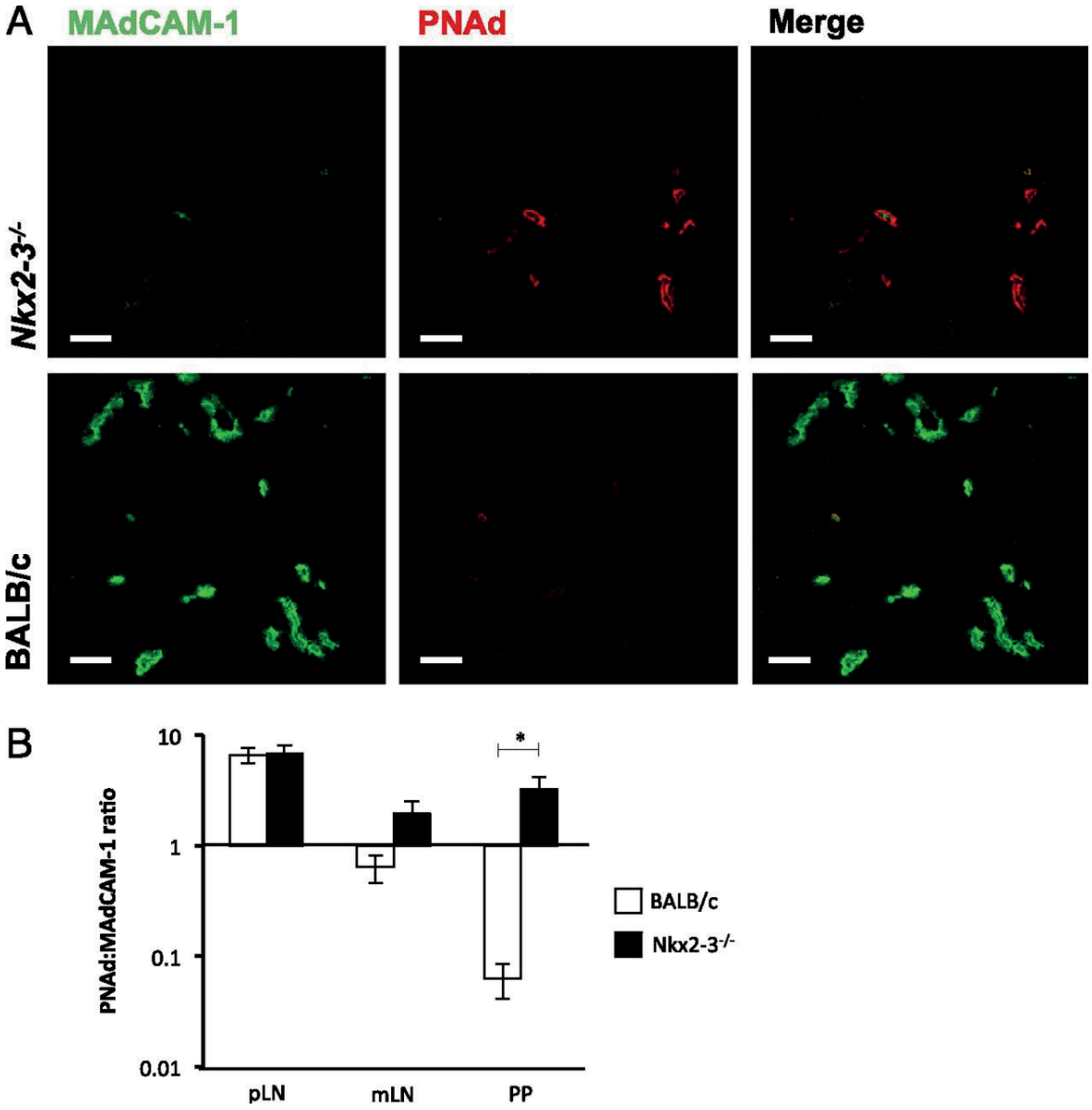
Munkánk következő szakaszában a MECA-79 antitest által felismert PNAd szulfoepitóp kifejeződését vizsgáltuk Nkx2-3 mutánsok PP HEV endotél sejtjein. A vaszkularizáció mértékének megítélésére először fiatal felnőtt (8 hetes) Nkx2-3 deficiens és vad típusú egerek PP-ból készült metszeteit anti-VEGF-R2 antitesttel jelöltük. Ennek során nem találtunk észrevehető különbséget. A HEV addresszin profil meghatározására MAdCAM-1 és PNAd-specifikus antitestekkel kettős jelölést végeztünk. Vad típusú egérben intenzív luminális MAdCAM-1 és gyenge abluminális PNAd festődést tapasztaltunk, míg Nkx2-3 deficiens egérben nagymértékben növekedett luminális PNAd és gyenge perivaszkuláris MAdCAM-1 festődés mutatkozott. Hármas immunfluoreszcens festéssel (anti-Thy-1/CD90 és anti-B220 jelöléssel kiegészítve) a $PNAd^+$ erek többnyire a T-sejt zónában helyezkedtek el, a vad típusú mintákhoz hasonlóan (**6. 36. ábra**). A mutáns és kontroll szövetek VCAM-1 és ICAM-1 festődése között nem észleltünk különbséget.

A PNAd luminális jelenlétének megerősítésére Nkx2-3 mutáns és vad típusú egereket vénásan oltottunk DyLight-594 fluoreszcens festékkel jelölt MECA-79 és FITC-jelölt anti-MAdCAM-1 antitestekkel. A mutáns PP HEV érképletei intenzív PNAd festődést és csak helyenként megfigyelhető MAdCAM-1 jelölődést mutattak. Ezzel ellentétben a vad típusú egerekben intenzív MAdCAM-1 és gyenge PNAd festődést észleltünk. A PNAd:MAdCAM-1 (vörös:zöld) expreszsziós arányt emissziós fotonszámlálással kvantitáltuk, ennek során a mutáns PP átlagos vörös:zöld aránya 3,26 volt, ami a vad típusú mintákban mért arány (0,06, p=0,026) többszöröse (**6.37. ábra**).

A homing addresszinek jelenlétén kívül a PP homing folyamathoz szükség van a T-zóna HEV felületén a CCL21, a follikulusok területén a CXCL13 kemokinekre (Förster és mtsai, 1999; Warnock és mtsai, 2000; Okada és mtsai, 2002). Immunfluoreszcens jelöléssel mindkét kemokin jelenlétét a megfelelő elhelyezkedésben igazolni tudtuk (**6.38. ábra**). Összefoglalóan ezen adatok azt igazolják, hogy Nkx2-3 hiányában a PP HEV felszínén MAdCAM-1 addresszin helyett PNAd fejeződik ki az endotél sejteken, de a mutáció ellenére ezek az endotél sejtek

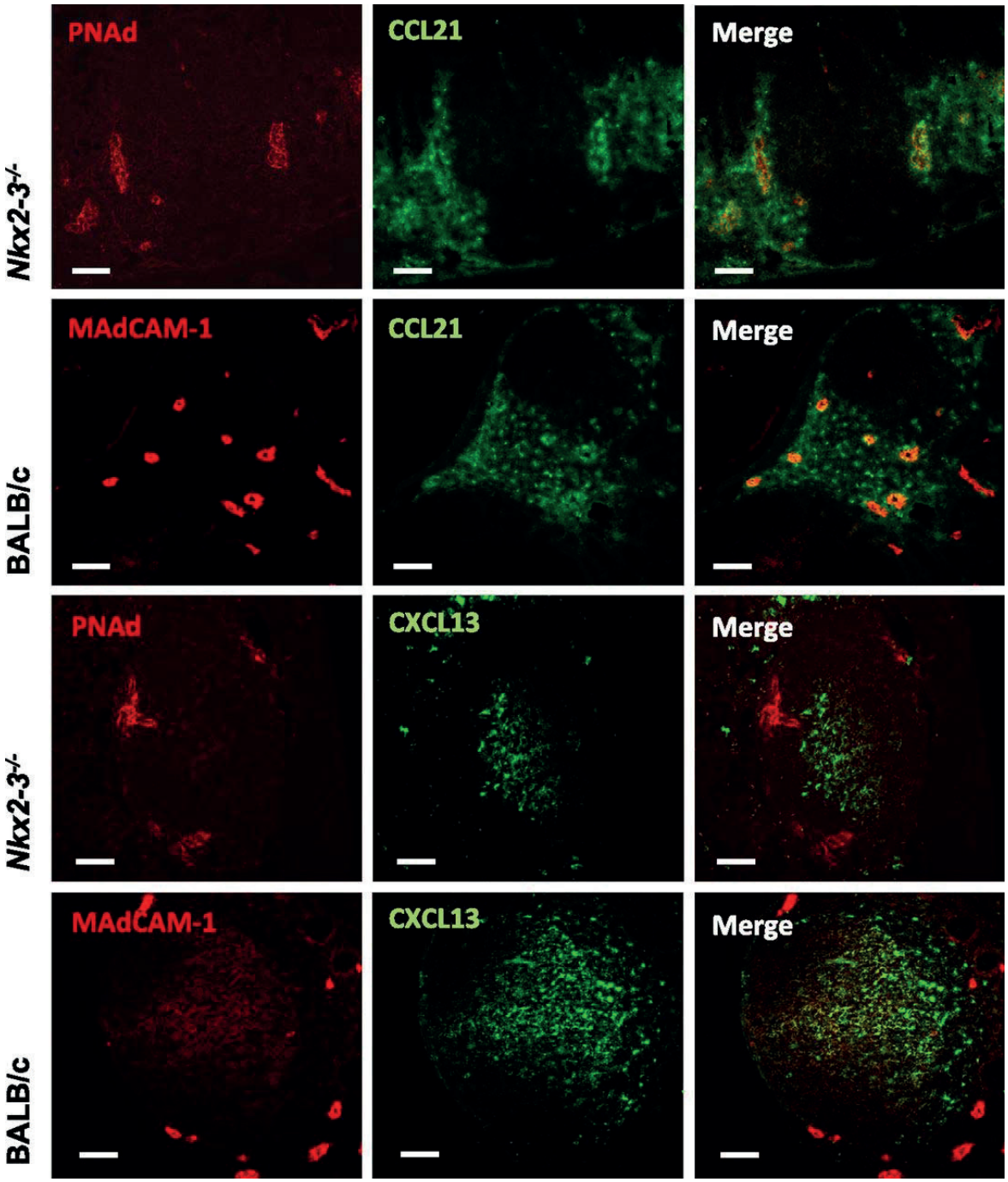


6.36. ábra: Nkx2-3 deficiens egerek PP HEV addresszin profilja és megoszlása
Normál BALB/c egérből és Nkx2-3-hiányos egér PP-ból készített fagyasztott metszetek (**A**) immunfluoreszcens jelölése CD45 (zöld) és a jelölt endoteliális markerekkel (vörös) MAdCAM-1 csökkenést és PNAd expresszió-fokozódást mutat. A képek genotípusonként öt állatból származó mintákon kapott reprezentatív eredményt mutatják. A hármas jelöléses immunfluoreszcens festés (**B**) szerint az Nkx2-3 mutánsokban a PNAd-pozitív HEV-ek (vörös) a B220-pozitív nyiroktüszők (kék) közé ékelődő Thy-1-pozitív T-sejt zóna területén helyezkednek el, hasonlóan a normál egérben található MAdCAM-1 pozitív HEV-ekhez. A nyilak HEV keresztmetszeteket mutatnak. (A képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják. Lépték= 200 µm.) *Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O'Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, Balogh P. 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.*



6.37. ábra: A PNAd luminális expressziója Nkx2-3 mutáns PP HEV-ben

Intravénás oltást követően a FITC-konjugált MECA-367 anti-MAdCAM-1 antitest normál egérben (**A**) a HEV luminális felszínéhez kötődik, míg Nkx2-3 hiányos egérben a DyLight-594–jelölt (vörös) MECA-79 anti-PNAd kötődik a HEV endotél sejtekhez. Lépték=100 μm. (A képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják.) A két fluorokróm-jelölt addresszin-specifikus antitest kötődés arányát (**B**) foton-számlálással kvantifikálva a perifériás nyirokcsomókban (pLN) mindkét genotípusban a PNAd dominanciája jellemző, a hasi nyirokcsomókban (mLN) általában kiegyenlített MAdCAM-1/PNAd ko-expresszió figyelhető meg, míg Nkx2-3 egérben a PNAd mutat domináns kifejeződést. *Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O'Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, Balogh P. 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.*



6.38. ábra: Homeosztatikus kemokinek normál szöveti megoszlása Nkx2-3 mutáns PP-ban
Normál és Nkx2-3 hiányos PP-metszetek kettős jelölése a genotípusra jellemzően kifejeződő addresszin (vörös) és a HEV-asszociált CCL21, valamint az FDC-asszociált CXCL13 (zöld) jelöléssel kombinálva hasonló megoszlást mutat. (A képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják. Lépték= 100 μm.) *Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O'Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, Balogh P. 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.*

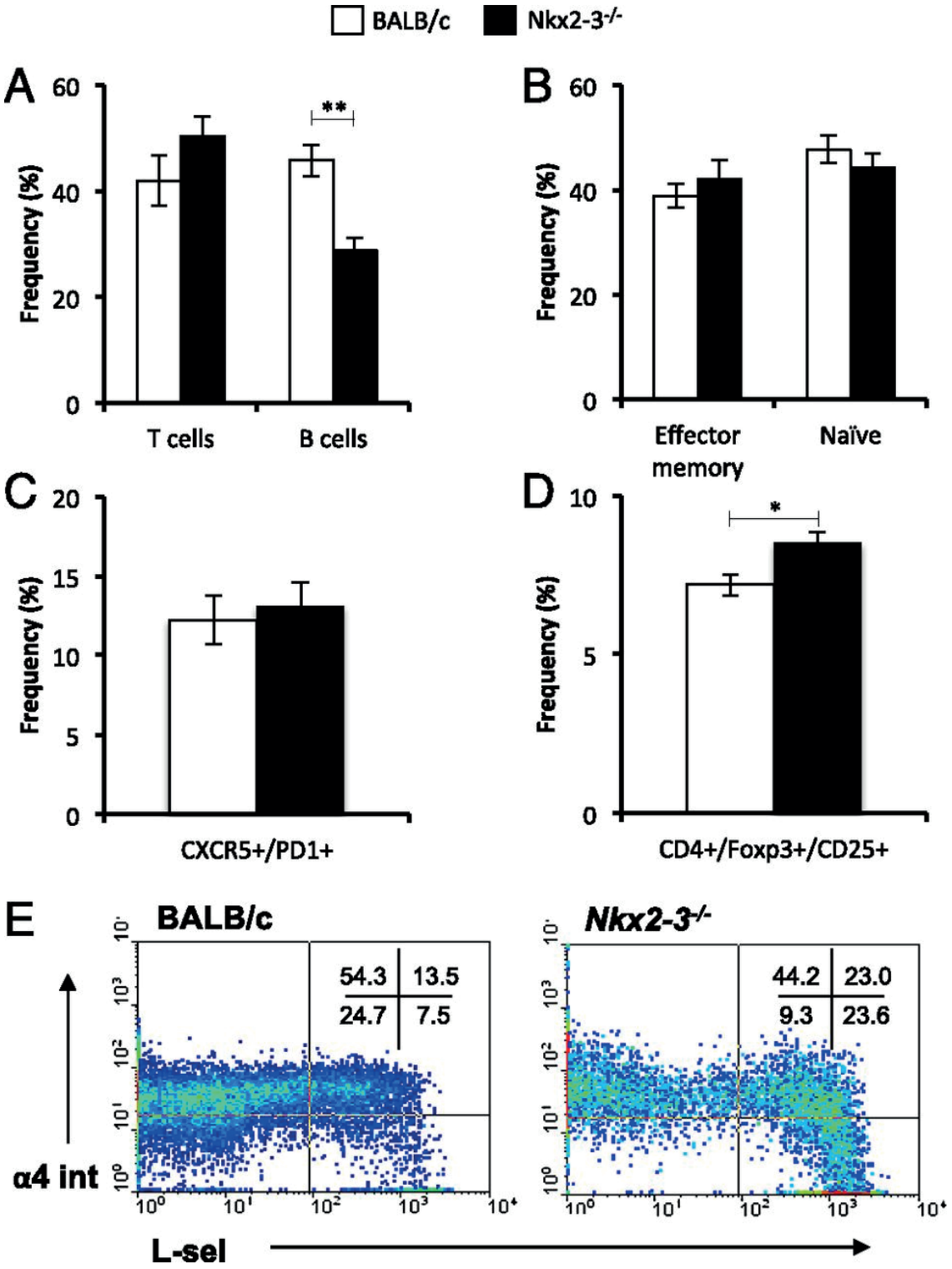
megtartják a rájuk jellemző homeosztatikus kemokin-termelésüket, amelyek fontos szerepet töltenek be a limfocita-megtelepedésben.

A megváltozott addresszin-profil PP limfocita-összetételre kifejtett hatását a limfociták áramlási citometriás vizsgálatával elemeztük. Anti-CD3 és anti-B220 festéssel a vad típusú PP mintákhoz hasonlítva a mutánsokban szignifikánsan csökkent B-sejt arányt és mérsékelten emelkedett T-sejt arányt találtunk. A $CD4^+$ T-sejt csoporton belül nem találtunk különbséget a ($CD44^{hi}$ $Lsel^{lo}$) és naív ($CD44^{lo}$ $Lsel^{hi}$), valamint follikuláris T helper ($CD4^+$/$CXCR5^+$/$PD1^+$) alcsoportok között. Ugyanakkor a regulátor T-sejtek ($CD25^{hi}$/$FoxP3^+$) gyakorisága nagymértékben (p=0,009) emelkedett az Nkx2-3 hiányos egerekben. A fokozott PNAd expressziónak megfelelően az Nkx2-3 mutáns PP limfocitái emelkedett L-szelektin expressziót mutattak (**6.39. ábra**).

6.8.3. A bél limfoid homing során a $PNAd^+$ HEV-ek kilépési kapuként működnek $Nkx2\text{-}3^{-/-}$ egérben

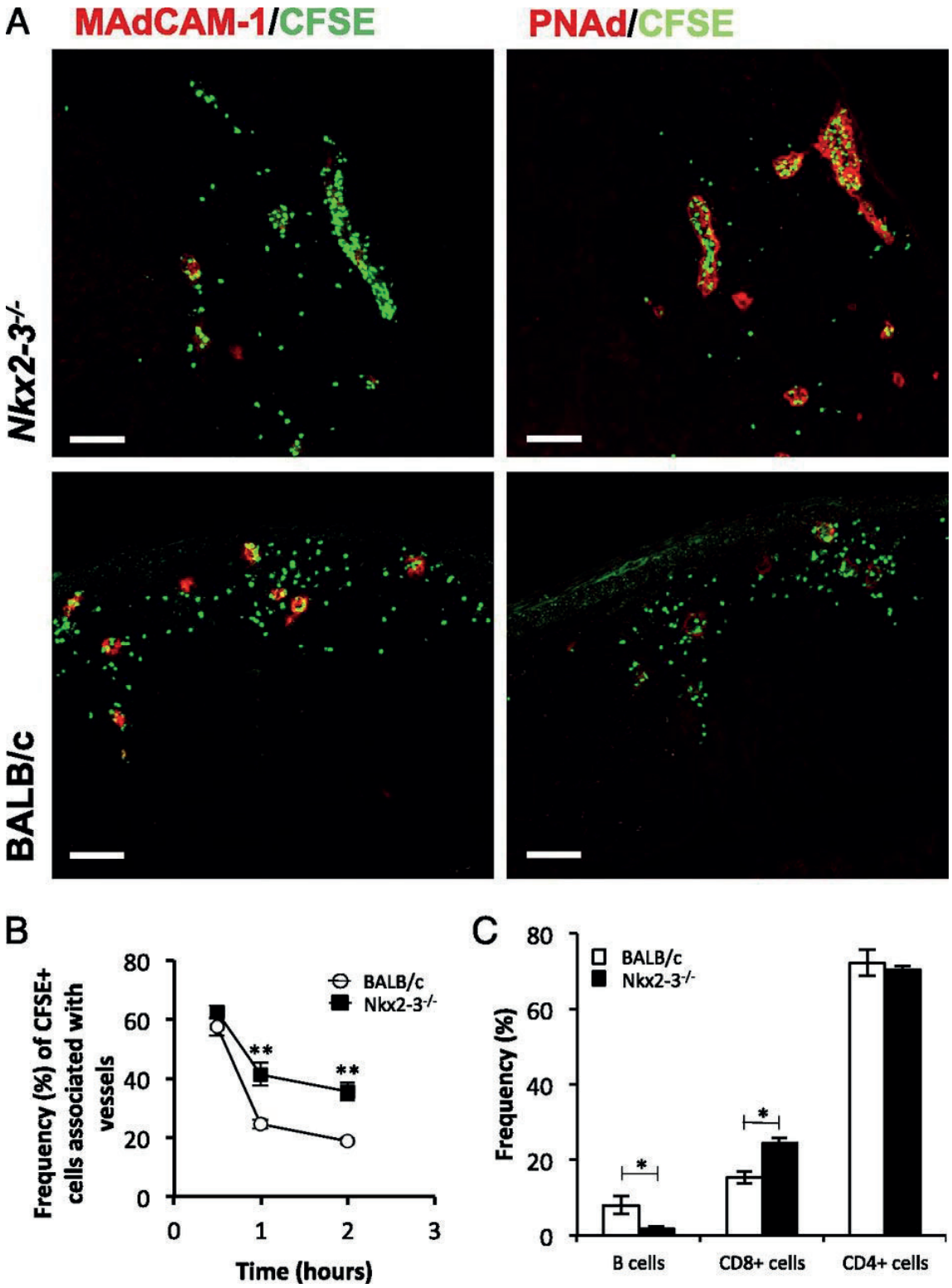
Az Nkx2-3 mutáns PP HEV endotél MAdCAM-1→PNAd addresszin váltásának a limfociták bél-homingjára kifejtett funkcionális hatását immunfluoreszcens és áramlási citométeres eljárásokkal vizsgáltuk. Az immunfluoreszcenciához CFSE-jelölt limfocitákat oltottunk intravénásan vad típusú és Nkx2-3 hiányos egerekbe, majd a recipienseket az oltás után 30, 60, és 120 perccel később terminálták immunhisztológiai feldolgozásra, anti-MAdCAM-1 és anti-PNAd festéssel. A CFSE-jelölt limfociták az Nkx2-3 mutáns egerekben a PNAd-pozitív HEV-hez, míg a vad típusú recipiensekben a MAdCAM-1 pozitív HEV-ekhez kapcsolódtak. A mutáns egerekben a CFSE-jelölt sejtek a HEV-ek közvetlen közelében helyezkedtek el, míg a vad típusú egerekben a PP mélyebbi rétegeibe jutottak el. Sejtszámlálással a VEGF-R2 pozitív erek mentén a mutánsokban szignifikánsan több sejt jelenlétét mutattuk ki (p=0,001). Az idő előrehaladtával ez a különbség a kontroll és mutáns egerek között nőtt, ami a limfocitáknak a mutáns HEV endotél sejteken való lassabb keresztüljutását jelzi.

A különböző limfocita alcsoportok homing kinetikájának vizsgálatára a következő kísérletünkben BALB/c^{eGFP} transzgenikus egérből származó limfocitákat oltottunk vad típusú és kontroll recipiensekbe, majd a PP limfocitákat anti-CD4, anti-CD8 és anti-B220 antitesttel jelöltük. Bár a beoltott sejtek közel hasonló mennyiségben tartalmaztak B-sejteket, $CD4^+$ és $CD8^+$ T-sejteket (B220: 27,85%, CD4: 37,33%, CD8: 21,68%), mind a vad típusú, mind a mutáns PP-ban elsősorban T-sejtek telepedtek meg. A megtelepedett donor sejtek közül a $CD4^+$ T-sejtek képezték az abszolút többséget mindkét recipiensben, míg az Nkx2.3 mutánsokban a megtelepedő B-sejt gyakoriság csökkent, a $CD8^+$ T-sejt gyakoriság nőtt a vad típusú recipiensekhez képest (**6.40. ábra**).



6.39. ábra: A PP limfocita-alcsoport összetétele

BALB/c egerekhez hasonlítva az Nkx2-3-hiányos egerek PP-ja magasabb arányban tartalmaz T-sejtet és szignifikánsan kisebb arányban B-sejtet (**A**). A follikuláris helper T-sejtek (T_{FH}) és a memória T-sejt összetétel (**B/C**) nem különbözik az Nkx2-3 mutáns és vad típusú egér PP minták között. Nkx2-3-hiányos egérben a regulátor T-sejtek (Treg) (**D**) gyakorisága szignifikánsan magasabb. Az Nkx2-3-hiányos egerek PP-jában az L-szelektint kifejező sejtek gyakorisága (**E**) fokozódott (a jobb felső kvadránsban lévő számok a reprezentatív minta sejt-gyakoriságát mutatják). Az oszlopdiagramok az átlagot ± SEM értékeket mutatják ($n \geq 5$ egér, $^*p < 0{,}05$, $^{**}p < 0{,}001$). *Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O'Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, Balogh P. 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.*



6.40. ábra: Sejt-belépés az Nkx2-3 mutáns és normál PP-ba

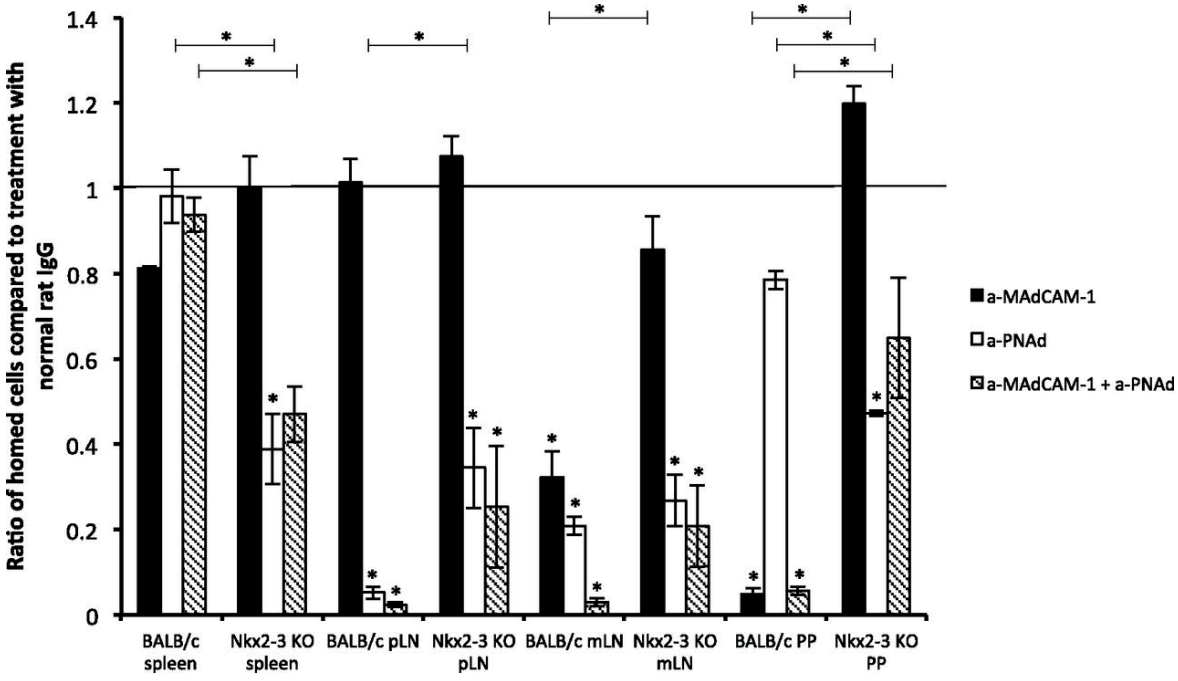
CFSE-jelölt limfociták intravénás oltását (**A**) követően mutáns PP-ban a jelölt sejtek PNAd-pozitív HEV-hez, BALB/c egérben a MAdCAM-1-pozitív HEV-hez kapcsolódnak (Lépték= 100 μm). A HEV-kapcsolódást követően Nkx2-3 egérben a normál kontrollhoz hasonlítva csökken az érpályából való kilépés (**B**) a környező szövetekbe. Átvitelt követően a mutáns PP-ba fokozódott a megtapadó $CD8^+$ T-sejtek aránya és csökkent a B-sejtek aránya (**C**) a vad típusú kontrollhoz hasonlítva. A PP-ban megtapadó $CD4^+$ T-sejt gyakoriságban nincs különbség $*p < 0,05$, $**p < 0,001$. *Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O'Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, Balogh P. 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.*

6.8.4. A PP homing in vivo gátlása anti-PNAd antitesttel Nkx2-3 mutáns egerekben

A MAdCAM-1→PNAd addresszin váltásnak a GFP-jelölt limfociták megtelepedésének mechanizmusára kifejtett hatását anti-PNAd, anti-MAdCAM-1 és ezek kombinálásával végzett blokkolással elemeztük. Az értékeléshez a vad típusú és Nkx2-3 mutáns különböző nyirokszöveteiben a GFP⁺ donor sejtek megtapadásának mértékét hasonlítottuk össze.

Normál lépben sem az anti-MAdCAM-1, sem az anti-PNAd kezelés nem okozott mérhető GFP⁺ limfocita megtapadás-különbséget. Az Nkx2-3 hiányos recipiensek anti-PNAd kezelése viszont szignifikánsan csökkentette a jelölt limfociták bejutását, összhangban az L-szelektinnek a limfociták PNAd⁺ ektópiás HEV-eken keresztül az Nkx2-3 mutáns lépbe való eljutásában betöltött szerepével (Czömpöly és mtsai, 2011).

A perifériás nyirokcsomókba való eljutást az anti-PNAd kezelés mindkét recipiensben gátolta, míg az anti-MAdCAM-1 kezelés egyik recipiensben sem váltott ki mérhető eltérést. A hasi nyirokcsomókban vad típusú recipiens esetén az anti-PNAd kezelés az anti-MAdCAM-1 antitest-kezelésnél erősebb gátlást fejtett ki, míg Nkx2-3 hiányos egérben az anti-PNAd jóval erősebb gátlást indukált. A MAdCAM-1 antitest-mediálta blokkolása az Nkx2-3 mutánsokban nem váltott ki mérhető hatást.

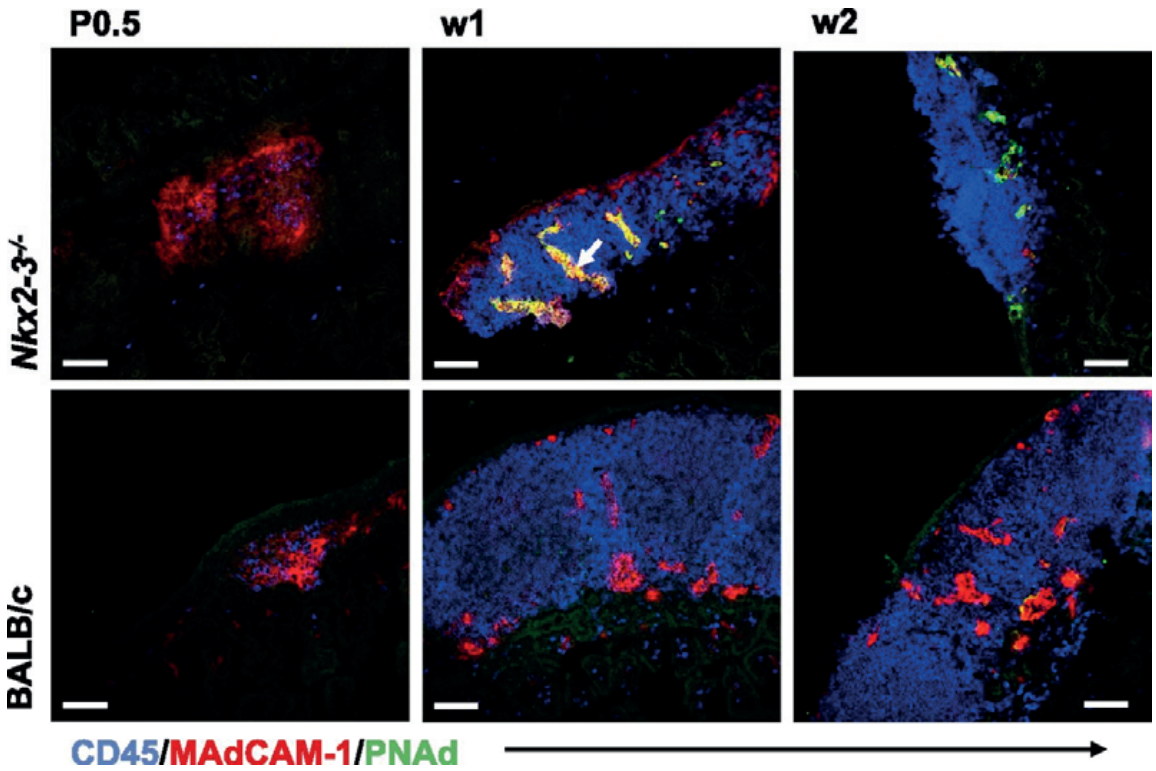


6.41. ábra: A mutáns MALT-ba irányuló homing függése a HEV PNAd-kapcsolódástól
Az oszlopdiagram előzőleg anti-PNAd, anti-MAdCAM-1, kombinált anti-PNAd/MAdCAM-1 és kontroll IgG-vel kezelt Nkx2-3 hiányos és BALB/c recipiens egerekbe intravénásan oltott GFP⁺ egér limfociták perifériás nyirokszöveti belépésének hatékonyságát mutatja. (GFP⁺ sejt % átlaga ± SEM, csoportonként minimum három egér, *$p < 0,05$.) *Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O'Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, Balogh P. 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.*

A vad típusú egerek anti-MAdCAM-1 antitesttel történő kezelése a PP homing szignifikáns csökkenését okozta, az anti-PNAd antitestnek nem volt mérhető hatása. Ezzel szemben az Nkx2-3 deficiens egerekben az anti-MAdCAM-1 antitest-kezelés volt hatástalan, míg az anti-PNAd antitest-kezelés szignifikánsan (p<0,05) csökkentette a PP homingot. Érdekes módon az anti-PNAd kezelést követően a mutáns PP homing-gátlás nem volt olyan mértékű, mint akár a vad típusú PP esetén az anti-MAdCAM-1 vagy a mutáns és vad típusú nyirokcsomók esetén az anti-PNAd blokkolás. A kombinált anti-MAdCAM-1/anti-PNAd kezelés nem fokozta a limfocita homing gátlását mutáns és vad típusú PP-ba (**6.41. ábra**).

6.8.5. Az Nkx2-3 mutáns PP HEV posztnatális MAdCAM-1→PNAd váltáshoz limfotoxin szignalizáció szükséges, és a folyamatot érett T- és B–sejtek fokozzák

Az egér perifériás nyirokcsomók posztnatális érésére vonatkozó korábbi adatok szerint az újszülöttkori HEV endoteliális MAdCAM-1 expressziója fokozatosan megszűnik, és azt az első hetek/hónap során PNAd váltja fel (Mebius és mtsai, 1996). Ez a folyamat a nyirokcsomók T- és



6.42. ábra: Posztnatális addresszin-váltás az Nkx2-3 mutáns egerek MALT HEV-jeiben
Újszülött (<p0,5), egy hetes (w1) és két hetes (w2) normál BALB/c és Nkx2-3 deficiens PP metszetein CD45 (kék), MAdCAM-1 (vörös) és PNAd (zöld) hármas jelöléses immunfluoreszcens vizsgálattal az újszülött mutáns egérben átmeneti MAdCAM-1 kifejeződés detektálható, majd egy hetes korban a PNAd/MAdCAM-1 együttes kifejeződése jellemző. Két hetes korra a mutáns egerekben a PNAd, míg normál BALB/c egérben végig a MAdCAM-1 a PP HEV domináns addresszin. Lépték= 100 µm. (A képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják.) *Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O'Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, Balogh P. 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.*

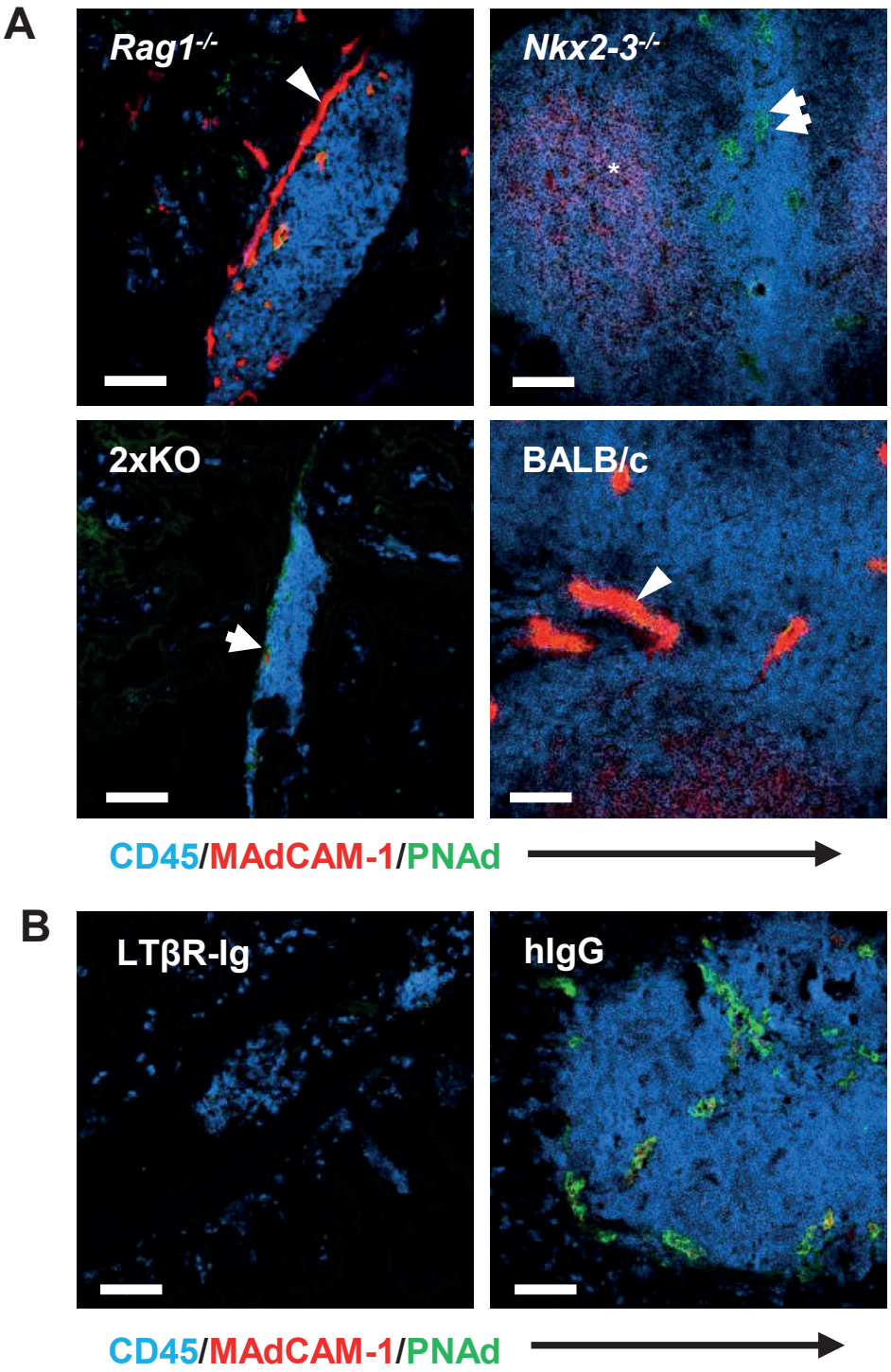
B-sejtes kolonizációjával egyidejűleg zajlik, és a HEV endotél sejteken kifejeződő LTβR által közvetített szignálokat igényli (Browning és mtsai, 2005; Onder és mtsai, 2013). Az Nkx2-3 hiányos egerek PP nyirokcsomó-szerű limfocita összetétele és addresszin-fenotípus változása miatt a folyamat LT-függését és limfoid megtelepedéssel való kapcsolódását vizsgáltuk.

Először a MAdCAM-1→PNAd váltás időpontjának meghatározására és limfocita-kolonizációjával való kapcsolatára különböző időpontokban vett PP mintákon elemeztük a MAdCAM-1 és PNAd jelenlétét. Újszülött, egy hetes és két hetes egerekből készített bélmetszeteken anti-CD45, anti-MAdCAM-1 és anti-PNAd festéssel vizsgáltuk a PP addresszin jellemzőit. Újszülöttek éretlen PP endotél sejtjein mindkét genotípusban csak MAdCAM-1 addresszin fejeződik ki. Egy hetes korban az Nkx2-3 mutáns mintákon mindkét addresszin megjelenik, míg két hetes korra a HEV képletek többsége csak a MECA-79 anti-PNAd antitesttel festődött. Ezen posztnatális időtartam során vad típusú egerekben a PNAd addresszin nem detektálható, csak a MAdCAM-1 intenzív festődését észleltük (**6.42. ábra**). Ezen vizsgálatok során megfigyeltük, hogy a PNAd a bél-nyálkahártyán a fejlődő PP területére korlátozottan jelent meg, a lamina propria egyéb területein mind a MAdCAM-1, mind a PNAd hiányzott.

Normál egér perifériás nyirokcsomóján a PNAd megjelenéséhez a LTβR által közvetített szignalizáció szükséges (Browning és mtsai, 2005), ezért munkánk következő szakaszában a limfociták jelenlétének és a LTβR aktivitásának a mutáns HEV PNAd kifejeződésre kifejtett hatását vizsgáltuk két különböző eljárással. Először érett T- és B-sejtekkel nem rendelkező Nkx2-3 mutánsokat hoztunk létre *Nkx2-3*$^{-/-}$ x *Rag1*$^{-/-}$ deficiens egerek keresztezésével. A LTβR ligand-kötésének hatását újszülöttek LTβR-Ig fúziós fehérjével, mint receptor-kompetitorral az 1/3/5. posztnatális napokon végzett kezelésével vizsgáltuk.

Először *Nkx2-3*$^{-/-}$x*Rag1*$^{-/-}$ kettősen mutáns egereket kereszteztünk, és ezek PP érhálózatát hasonlítottuk vad típusú, Nkx2-3 hiányos és Rag-1-deficiens egerek mintáihoz. Ennek a kísérletnek az egyik nehézségét a *Rag-1*$^{-/-}$ és kettősen mutáns egerek PP-előalakjainak kis mérete jelentette, de ennek ellenére anti-CD45 festéssel kis limfoid csoportosulásokból álló csökevényes PP előtelepeket tudtunk azonosítani. *Rag-1*$^{-/-}$ egerekben az anti-PNAd és anti-MAdCAM-1 festéssel a CD45^{+} csoportosulásokban MAdCAM-1^{+} HEV képleteket figyeltünk meg, amelyeken nem volt kimutatható PNAd. Az *Nkx2-3*$^{-/-}$x*Rag1*$^{-/-}$ kettős mutánsokon csak minimális MAdCAM-1 reaktivitást tapasztaltunk, amik azonban kimutatható PNAd-expresszióval együtt. Ennek az intenzitása elmaradt az Nkx2-3 deficiens mutánsok festődésétől, ami alapján az érett T- és B-sejtek jelenléte nem szükséges a MAdCAM-1→PNAd váltáshoz, ugyanakkor fokozza a PNAd kifejeződését.

Ezt követően a LTβR aktivitásának a jelentőségét vizsgáltuk a PNAd posztnatális megjelenésében a PP érése során Nkx2-3 hiányos egerekben. A LTβR-Ig szolúbilis receptorral az első hét folyamán végzett ismételt kezelés után a 14. napon vizsgáltuk a PNAd megjelenését, normál humán IgG kezelt kontroll mintához hasonlítva. A kezelés biológiai hatékonyságát a lépben a (CR1.2 receptorok kimutatásával azonosítható) FDC-hálózat hiánya erősítette meg. A LTβR-Ig kezelés hatására a bélben a megfelelő méretű PP előalakok helyett kisméretű limfoid csoportosulások jöttek létre. Anti-CD45, anti-PNAd és anti-MAdCAM-1 festéssel ezekben a csopor-



6.43. ábra: Limfocita kolonizáció és LTβR aktivitás szerepe a posztnatális MAdCAM-1/PNAd váltásban
Négy hetes *Rag1*$^{-/-}$, *Nkx2-3*$^{-/-}$, kettős mutáns és normál BALB/c egérből készített PP metszetek (**A**) anti-CD45 (kék), anti-MAdCAM-1 (vörös) és anti-PNAd (zöld) jelölése *Rag1*$^{-/-}$ és BALB/c mintákban intenzív MAdCAM-1 expressziót mutat (nyílhegy). Az *Nkx2-3*$^{-/-}$ mintákban a MAdCAM-1 kifejeződés a PP stromális sejtekre (csillag) korlátozódik, a HEV PNAd-festődést mutat (kettős nyíl). A kettős KO egérben az éretlen PP előalakban gyenge MAdCAM-1/PNAd koexpresszió látható (nyíl). Újszülött Nkx2-3-hiányos egér LTβR-Ig szolúbilis receptorral (bal) végzett kezelése kéthetes korra megakadályozta a PNAd és MAdCAM-1 kifejeződését (**B**), míg a kontroll humán IgG nem gátolta meg a PNAd megjelenését, és nem befolyásolta a MAdCAM-1 reziduális expresszióját a PP-ban (jobb). Lépték= 100 μm. (A képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják.) *Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O'Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, Balogh P. 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.*

tosulásokban a két addresszin hiányát találtuk. Ezek az adatok azt igazolják, hogy a PNAd-pozitív HEV-ek képződése Nkx2-3 hiányos PP-ban a LTβR aktivitását igényli, amit non-T/B-sejtek nyújthatnak, de a fokozott PNAd expresszióhoz a limfoid kolonizáció során megtelepedő nagyobb számú T- és B-sejtekre van szükség (**6.43. ábra**).

Összefoglalóan az Nkx2-3 jelentősége a Peyer-plakk HEV-ekben a nyálkahártya-preferenciájú addresszin kifejeződésének domináns meghatározása, feltehetőleg a PNAd-mintázat gátlásán keresztül, ugyanakkor hiánya nem befolyásolja a MALT HEV-képződést. Ennek megfelelően a megjelenő PNAd összetétel (váz-fehérjék, valamint modifikáló enzimek) kevésbé különbözik a normál mukózális HEV jellemzőktől, mint a lépben létrejövő ektópiás HEV-ek esetében (Kellermayer és mtsai, 2014).

6.9. Az Nkx2-3 szerepe kísérletes vastagbélgyulladás kiváltásában

A bél immunrendszerének folyamatosan meg kell küzdenie a nagytömegű étel- és mikrobiális antigénekkel, és különbséget kell tennie ezek tolerálandó és eltávolítandó összetevői között. Ezeket a funkciókat a bélben két különböző fejlődésbiológiai csoportba sorolható nyirokszövetek látják el (Buettner és Lochner, 2016). A vékonybélben a Peyer plakkok (PP) és a vastagbélben a hasonló szerkezetű „colonic patch" (ColP) az embrionális fejlődés során alakulnak ki, míg az izolált nyiroktüszők és előalakjaik (összefoglalóan SILT – solitary intestinal lymphoid tissues) a születést követően jelennek meg.

A SILT spektrum legéretlenebb tagja a kriptoplakk (CP), amely a bél-kripták alján elhelyezkedő, T/B/NK sejtvonal-specifikus hematopoetikus markereket nem kifejező (Lin^-) limfoid sejtekből és dendritikus sejtekből álló kisméretű konglomerátum (Kanamori és mtsai, 1996). Környezeti hatásra ezek a CP képletek izolált nyiroktüszőkké (ILF – isolated lymphoid follicles) transzformálódnak (Bouskra és mtsai, 2008; Kiss és mtsai, 2011), ami egyedülálló módon nem *in situ* limfocita-érési folyamatként zajlik, hanem a nyirokszövet-típus komplex transzformációjának az eredménye. Ezen folyamat során a megtelepedő limfociták (túlnyomórészt B-sejtek) a MAdCAM-1 addresszint hordozó magas endoteliális venulák (HEV) és lamina propria ereken keresztül jutnak el a fejlődő nyiroktüszőhöz (Wang és mtsai, 2008; Knoop és mtsai, 2011).

Egérben a PP HEV endotél érésében az Nkx2-3 fontos szövet-specifikus irányító szerepet tölt be. Hiányában a PP HEV és a lép marginális szinusz endotél nem expresszálja a MAdCAM-1 addresszint (Pabst és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 2000), és mindkét nyirokszövet $PNAd^+$ érképletek képződéséhez vezető perifériás nyirokcsomó-érmintázat váltást mutat (Czömpöly és mtsai, 2011; Kellermayer és mtsai, 2014). Crohn-betegségben és vastagbélgyulladásban szenvedő betegek Nkx2-3 génjének kódoló régiójában számos egypontos nukleotid-polimorfizmusról számoltak be, és számos GWAS tanulmány szerint mindkét esetben az Nkx2-3 gént szuszceptibilitási helyként határozták meg (Parkes és mtsai, 2007; Fisher és mtsai, 2008). Az Nkx2-3 transzkripciós faktor egyik, bélgyulladásban is érintett célgénje lehet a PTPN2, és szintén befolyásolhatja a bél mikrovaszkuláris szegmentumok VEGF szignalizációját és a vazokonstriktor hatású endothelin-1 termelődését (Yu és mtsai, 2011). Bár több egybehangzó adat is felhívja a figyelmet az Nkx2-3 gyulladásos bélbetegségben betöltött szerepére, a kórkép Nkx2-3-tól függő összetevői és a pontos patomechanizmusa jelenleg nem ismert.

A kórképben megfigyelhető limfoproliferatív elváltozás és gyakori ektópiás nyirokszövet-kialakulás modellvizsgálatára a következő munkánkban az Nkx2-3 faktor hiányának a SILT-képződésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. Eredményeink szerint ezekben a mutánsokban az éretlen SILT összetevők dominanciája és az ILF érés gátlása jellemző, valamint Nkx2-3 hiányában az egerek rezisztensek a DSS kémiai irritáns által kiváltott bélgyulladásra. A csökkent gyulladás-hajlam független a MAdCAM-1 hiányától, ugyanis a megtartott Nkx2-3 aktivitással rendelkező MAdCAM-1-hiányos egerek az Nkx2-3-hiányos mutánsokhoz képest fokozottan érzékenyek a DSS-indukálta gyulladásra. Az Nkx2-3-hiányos egerekben a csökkent gyulladás-hajlam fokozott vastagbél hám-regenerációhoz társul, és emelkedik a vastagbél $ROR\gamma t^+$ ILC3, Th17

és FoxP3$^+$ regulátor T-sejtek száma is. Annak ellenére, hogy Nkx2-3-hiányos egerekben az IL-22 citokin mRNS szintje emelkedett, a citokin antitest-közvetítette *in vivo* inaktiválása nem fokozta a gyulladás súlyosságát. Az Nkx2-3 hematopoetikus sejtekre korlátozódó hiánya nem védte meg a vad típusú egereket a bélgyulladástól, ami az Nkx2-3 transzkripciós faktort kifejező stromális sejteknek a bélhám integritásában és a limfoid sejtek helyi homeosztázisában betöltött szerepére utal (Kellermayer és mtsai, 2019).

6.9.1. Gátolt ILF érés az Nkx2.3$^{-/-}$ egér vastagbelében

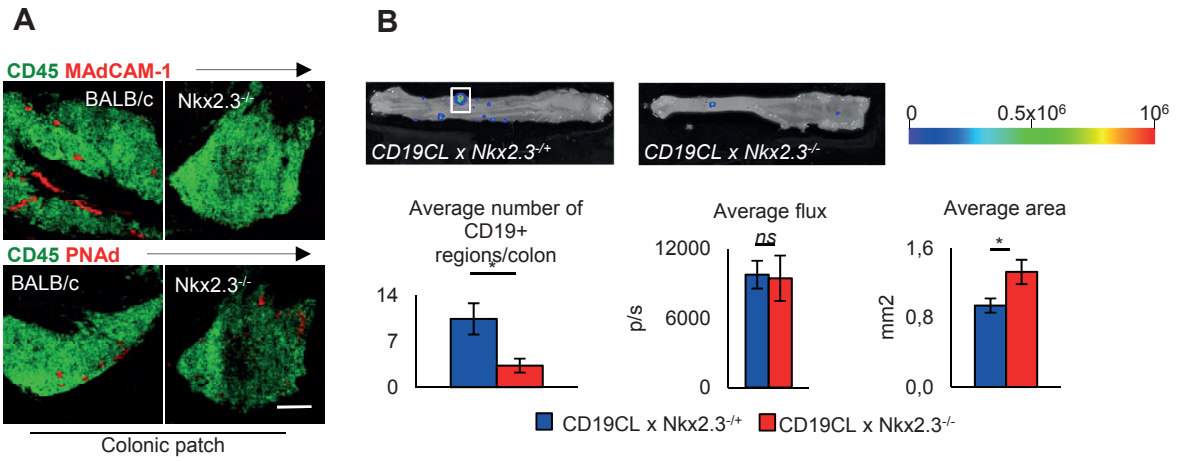
Az Nkx2-3 hiányos egerekre vonatkozó releváns adatok hiányában elsőként a mutáns egerek SILT összetételét vizsgáltuk a vastagbélből készült metszetek immunfluoreszcens analízisével. Ennek során a MAdCAM-1 hiánya mellett az Nkx2-3-deficiens egerek ColP területén lévő HEV endotél sejtek luminális felületén PNAd jelenlétét figyeltük meg, a vad típusú BALB/c egérre jellemző abluminális PNAd expresszióval ellentétben (**6.44. ábra**).

Az Nkx2-3 hiánynak a béltraktus globális B-sejt megoszlásra gyakorolt hatásának vizsgálatára az Nkx2-3-hiányos egereket CD19CherryLuciferáz (mCD19CL) egerekkel (Scotto és mtsai, 2012) kereszteztük, így ezek B-sejtjei luciferáz-aktivitásuk révén kemolumineszcens eljárással nagy érzékenységgel kimutathatóak. A teljes vastagbél *ex vivo* bioluminescens bioimaging eljárással történő vizsgálatával az Nkx2-3-hiányos egerekben a B-sejt csoportosulások nagyfokú csökkenését észleltük az Nkx2-3 heterozigóta mintákhoz viszonyítva (**6.44. ábra**).

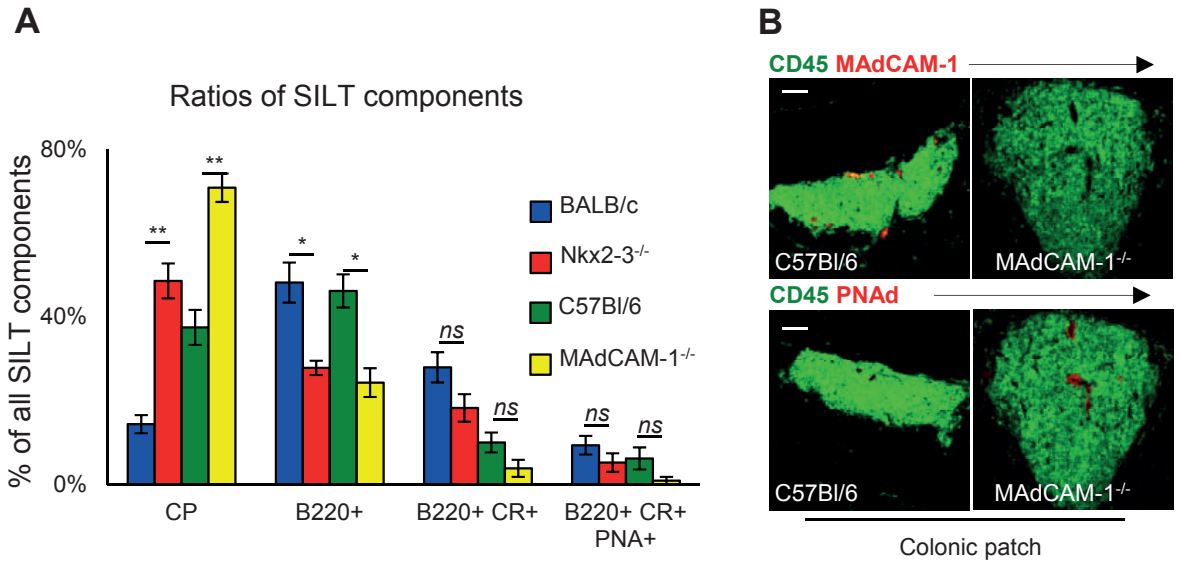
A SILT összetevők érettségi állapotát Thy-1/CD90, B220, komplement receptor (CR1.2) és a csíracentrumok földimogyoró lektin (peanut agglutinin, PNA) jelölésével kombinált négyszeres immunfluoreszcens festésével vizsgáltuk. A jelölés szerint így elkülöníthetők a (1) kriptoplakkok (CP; Thy-1$^+$/B220$^-$), (2) éretlen ILF (Thy-1$^{+/-}$/B220$^+$), (3) FDC-vel rendelkező éretlen ILF (Thy-1$^-$/B220$^+$/CR1.2$^+$) és (4) csíracentrumot tartalmazó érett ILF (Thy-1$^-$/B220$^+$/CR1.2$^+$/PNA$^+$). Nkx2-3-hiányos egérben az éretlen formációk jelentős túlsúlyát találtuk (**6.45. ábra**). Így az Nkx2-3 mutáns egerekben a CP gyakorisága háromszorosa volt a vad típushoz képest, míg az érettebb ILF variánsok általában feleannyi gyakorisággal fordultak elő, mint a vad típusú kontrollokban. Ezek a megfigyelések jelzik, hogy ugyan a CP képletek kialakulnak Nkx2-3 hiányában, de érettebb formákká való differenciálódásuk részlegesen blokkolt.

Annak meghatározására, hogy a megváltozott SILT összetétel az endoteliális MAdCAM-1 hiánya, vagy az Nkx2-3 hiányának egyéb transzkripcionális következménye miatt alakul ki, megvizsgáltuk a MAdCAM-1-hiányos (Schippers és mtsai, 2009), de normál Nkx2-3 aktivitással rendelkező egerek SILT összetételét is. Az Nkx2-3-hiányos egerekhez hasonlóan luminális PNAd-kifejeződést detektáltunk, ugyanakkor a SILT komponensek az Nkx2-3 hiányos egerekhez képest is kevésbé érett összetételűek voltak (**6.45. ábra**).

A vastagbél CP érett ILF képletté történő transzformációja jellegzetes fehérvérsejt-összetételi változással jár, amely során a felnőtt limfoid szövet indukáló (LTi) típusú veleszületett limfoid sejteket (ILC3) és CXCL13-termelő dendritikus sejteket B-sejtek váltják fel (McDonald és mtsai, 2010). Áramlási citometriás vizsgálataink során Nkx2-3-hiányos és MAdCAM-1-hiányos



6.44. ábra: Nkx2-3 hiányának hatása a vastagbél HEV addresszin kifejeződésre és B-sejt kolonizációra
BALB/c és Nkx2-3 vastagbél ColP-ból készített metszeteken (**A**) PNAd és MAdCAM-1 jelölés (vörös) során az Nkx2-3$^{-/-}$ egér vékonybél PP-ban megfigyelt addresszin-váltás látható (lépték= 200µm). (A képek három különböző alkalommal legalább három egéren elvégzett kísérlet reprezentatív eredményét ábrázolják.) Az mCD19Luc x Nkx2-3 egerekben Nkx2-3 hiányában kevesebb, de nagyobb méretű B-sejt csoportosulás alakul ki az Nkx2-3 haploinszufficiens egerekhez viszonyítva (**B**). A heterozigóta mintában bekeretezett terület egy ColP, amit az összehasonlításból kizártunk. Az oszlopdiagramok az egyedileg detektálható Luc-pozitív csoportok számát, össz-jelet és a jelforrás méretét ábrázolják (átlag + SEM, *n* = 3–5 állat csoportonként, **p*<0,05). *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*



6.45. ábra: Az Nkx2-3$^{-/-}$ és MAdCAM-1$^{-/-}$ mutáció hatása a vastagbél SILT spektrumra
A BALB/c, Nkx2-3$^{-/-}$, C57Bl/6 és MAdCAM-1 egerek vastagbeléből készített „Swiss roll" metszetek (**A**) kombinált anti-Thy-1, anti-B220, anti-CR1.2 immunfluoreszcencia és PNA lektin-fluoreszcencia vizsgálati eredményei (átlag ± SEM, n = 5–7 állat genotípusonként, **p*<0,05). A MAdCAM-1 genomiális hiánya az Nkx2-3 hiánya által okozott transzkripcionális MAdCAM-1 gátláshoz hasonlóan PNAd-kifejeződéshez vezet (**B**) a ColP HEV endotél sejtekben az anti-MAdCAM-1 és anti-PNAd (vörös) és anti-CD45 (zöld) kettős immunfluoreszcens jelölés alapján (Lépték= 100 µm). Az immunfluoreszcens képek egy legalább öt állatból álló csoportra jellemző eredményt mutatják. *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*

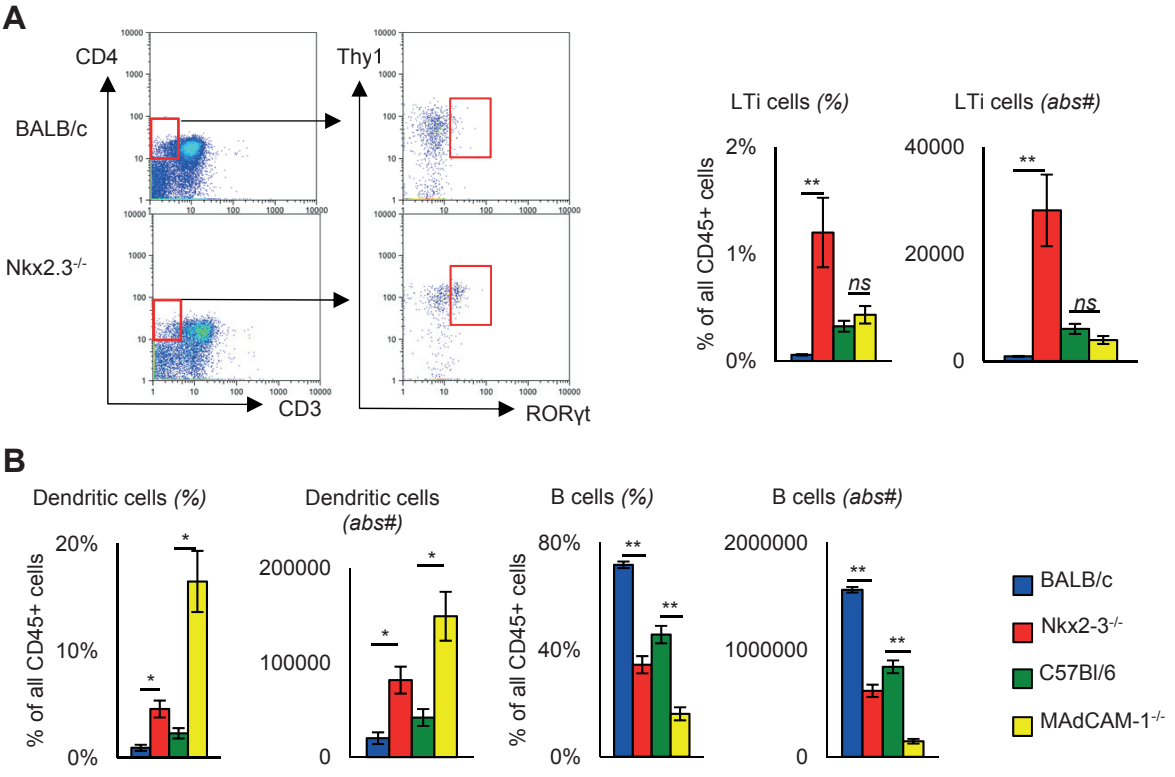


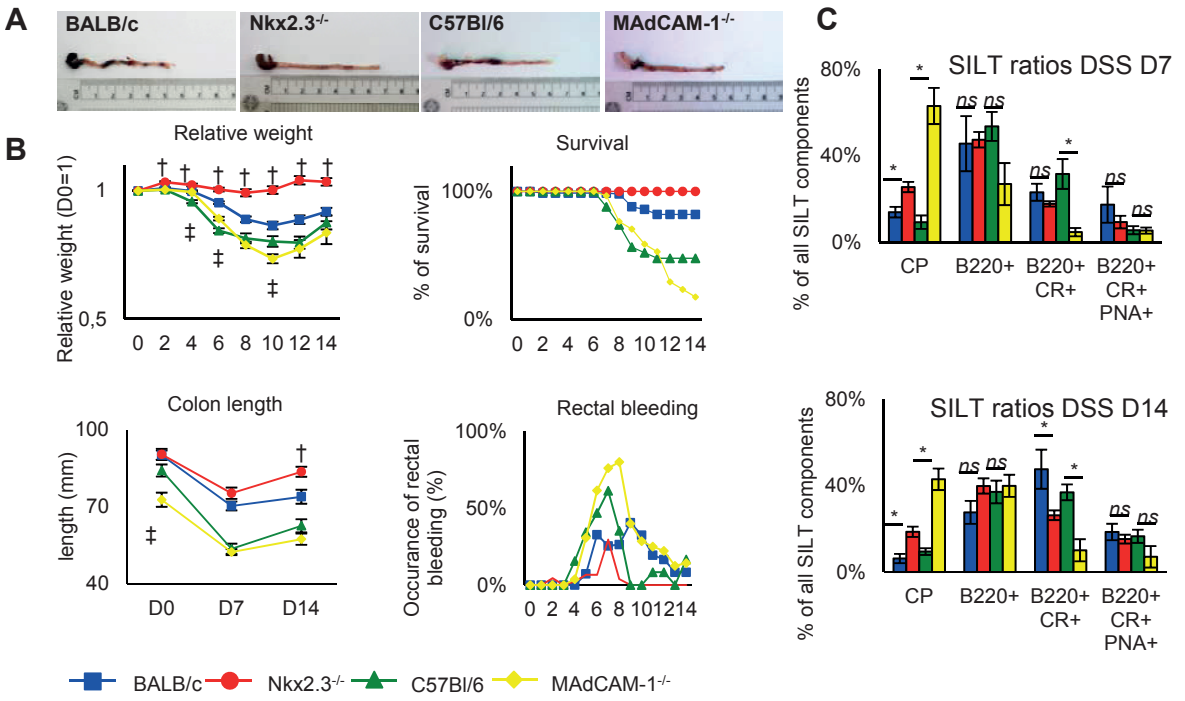
Fig. 6.46. Az Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányának hatása a vastagbél SILT-alkotó sejtek gyakoriságára
A CD3$^-$/CD4$^+$/RORγt$^+$/Thy-1$^+$ fenotípusú LTi sejtek áramlási citometriás meghatározása és reprezentatív eredménye (**A**) BALB/c és Nkx2-3$^{-/-}$ egér vastagbél-mintájában. Az oszlopdiagramok a jelölés szerinti genotípusú egerek LTi sejtjeinek az össz-CD45$^+$ sejthez viszonyított relatív gyakoriság és abszolút szám átlagát ± SEM ábrázolják (*p < 0,05, **p < 0,005. ns, nem szignifikáns). A vastagbél SILT-fejlődésben részt vevő egyéb sejtjeinek gyakorisága Nkx2-3$^{-/-}$ és MAdCAM-1 hiányában (**B**). Az oszlopdiagramok a jelölés szerinti genotípusú egerek dendritikus sejtjeinek és B-sejtjeinek az össz-CD45$^+$ sejthez viszonyított relatív gyakoriság és abszolút szám átlagát ± SEM ábrázolják (*p < 0,05, **p < 0,005. ns, nem szignifikáns). *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*

egerek vastagbelében szignifikánsan nagyobb számban találtunk Lin$^-$/Thy-1$^+$/CD4$^+$/RORγt$^+$ LTi sejteket és CD11c$^+$ dendritikus sejteket és kevesebb számban CD19$^+$ B-sejteket (**6.46. ábra**).

Ezek az adatok jelzik, hogy a MAdCAM-1 hiánya akár közvetetten (az Nkx2-3 hiányának következményeként) akár közvetlenül (a MAdCAM-1 genomiális hiánya miatt) a vastagbél SILT-érés gátlását és a limfocita összetétel megváltozását okozza.

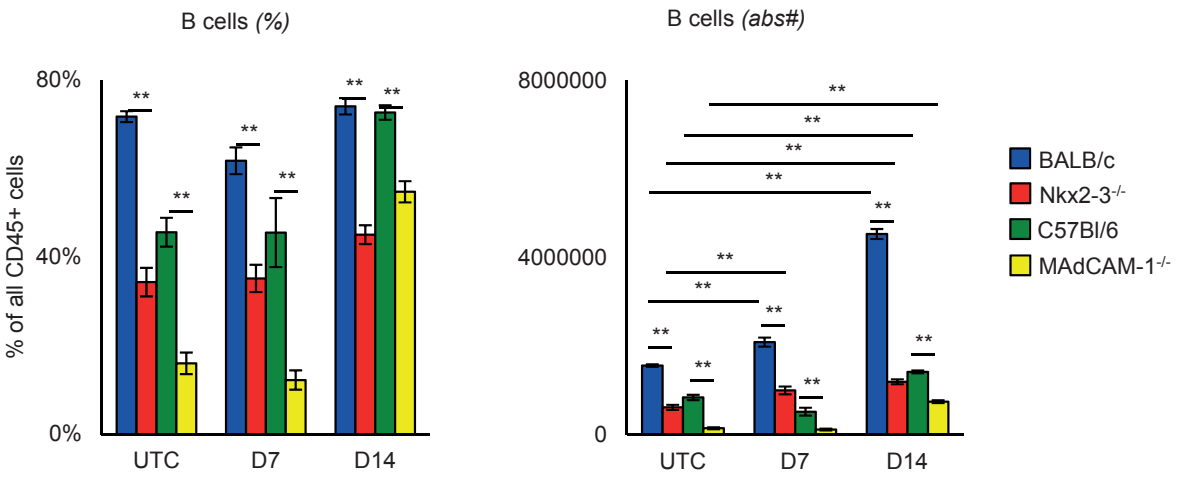
6.9.2. Az Nkx2-3 hiányos egerek védettek a DSS-indukált bélgyulladással szemben

Bélgyulladás hatására a CP érett ILF képletekké alakulnak (Lochner és mtsai, 2011; Olivier és mtsai, 2016). A spontán SILT képződés eltéréseinek vizsgálata után munkánk következő szakaszában az Nkx2-3-nak a DSS-kezeléssel indukált bélgyulladás révén kiváltott SILT-érésre kifejtett hatását vizsgáltuk. Nkx2.3-hiányos egereket 2,5%-os DSS-tartalmú vízzel itattunk hét napon keresztül. A hetedik napi (akut gyulladás) és az azt követő hét napos DSS-mentes víz



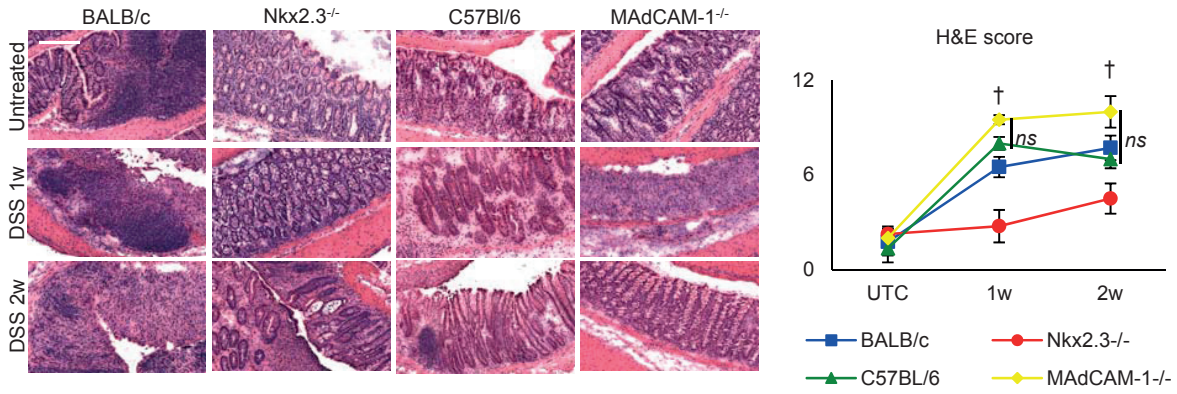
6.47. ábra:Nkx2.3$^{-/-}$ egerek rezisztenciája DSS-kezeléssel kiváltott vastagbélgyulladással szemben

A vastagbél-rövidülés mint bélgyulladásra jellemző paraméter (**A**) reprezentatív képe a jelzett genotípusú mintákban. A vastagbél-gyulladásra jellemző fizikális paraméterek (**B**) változása DSS-kezelés során az akut gyulladás kiváltására (átlag ± SEM, $n > 50$ egér genotípusonként). Egyszeres kereszt (†) jelzi a BALB/c és Nkx2.3$^{-/-}$ közötti, a kettős kereszt (‡) a C57BL/6 and MAdCAM-1$^{-/-}$ közötti szignifikáns (*p<0,05) különbséget. Ns, nem szignifikáns. A DSS-kezelést követően kialakuló akut (D7) és krónikus (D14) bélgyulladás során a SILT-összetevők megoszlása (**C**) a vastagbél „Swiss roll" metszetek immunfluoreszcens értékelése alapján. *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*



6.48. ábra: DSS kezelés hatása a vastagbél B-sejt gyakoriságra Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányos egerekben

Kezeletlen (UTC) egerekhez viszonyítva a CD45^{+} limfoid sejteken belüli megoszlás és a vastagbél össz-B-sejt szám BALB/c, Nkx2.3$^{-/-}$, C57BL/6, és MAdCAM-1$^{-/-}$ egerekben (n = 3–16 állat/genotípus/csoport). Átlag ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,005. D7, 7. nap; D14, 14. nap; ns, nem szignifikáns. *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*



6.49. ábra:BALB/c, Nkx2.3$^{-/-}$, C57BL/6, és MAdCAM-1$^{-/-}$ vastagbél H&E festett mintái hisztopatológiai értékelése

A 10X nagyítással készített mikrofotók a genotípusonként 3-8 állatból álló csoport mintáinak reprezentatív eredményét ábrázolják. A diagram az eredmények átlagát ± SEM mutatja (*p < 0,05, **p < 0,005, D7, 7. nap; D14, 14. nap; UTC, kezeletlen kontroll; ns, nem szignifikáns). *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*

itatása után 14. napi (krónikus gyulladás) bélmintákat vettünk, és ezek szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatával értékeltük a gyulladás nyirokszövet-indukciós hatását.

A fizikális jellemzők között az Nkx2-3 hiányos egerek súlyvesztése kisebb volt, ritkábban mutatkozott végbéltáji vérzés, a túlélés 100%-os volt, a vastagbél csak kis mértékben rövidült meg a BALB/c kontrollokhoz hasonlítva. Vad típusú kontrollokban a DSS kezelés hatására fokozódott a CR1.2^{+} FDC-tartalmú SILT-összetevők (PNA-pozitív csíracentrumokkal vagy nélkül) aránya. Nkx2-3 hiányos egerekben a 7. napig az érettebb struktúrák késleltetett fejlődést mutattak, ugyanakkor a különbség csökkent a 14. napra. A MAdCAM-1 mutánsokban súlyosabb fokú gátlást tapasztaltunk, mert a CP arány csökkenése és a B-sejt tartalmú struktúrák növekedése csak a 14. napon volt megfigyelhető (**6.47. ábra**). A SILT struktúrák összetétel-változásához hasonló B-sejt dúsulási kinetikát találtunk áramlási citometriás vizsgálatokkal is, ami alapján az Nkx2-3 mutáns egerekben a B-sejt szám kis mértékben már a 7. napon emelkedett, míg MAdCAM-1 mutánsokban csak a 14. napon detektáltunk B-sejt szám növekedést (**6.48. ábra**).

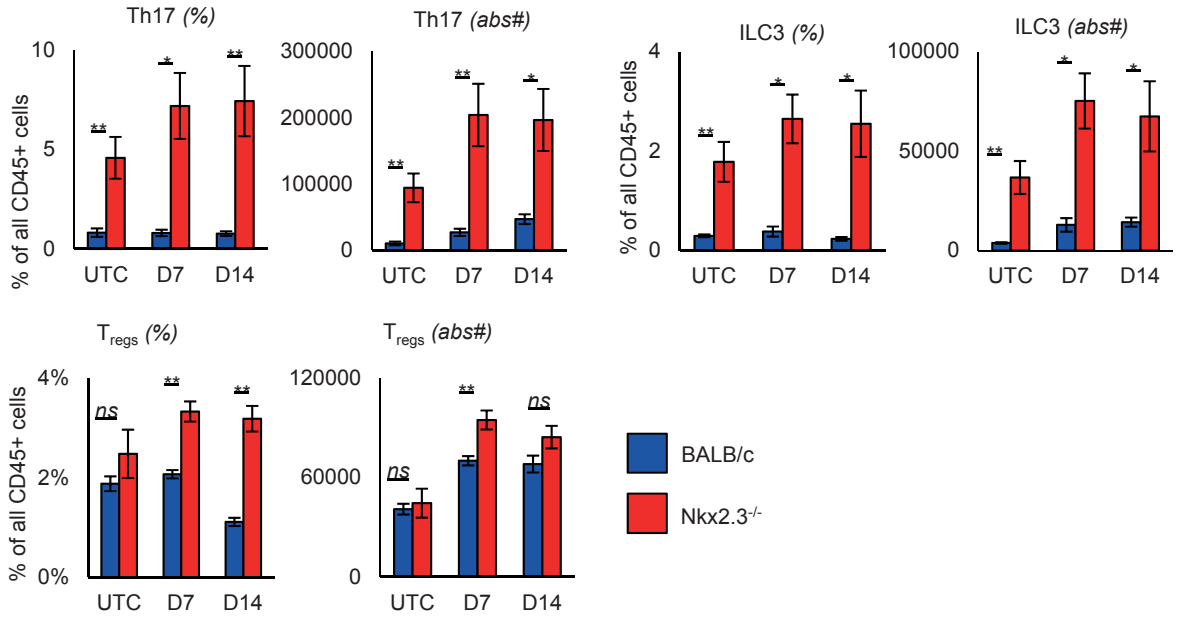
A bélmintákból készített Swiss Roll készítmények hematoxilin-eozin festést követően elvégzett hisztopatológiai értékelése (leukocita infiltráció) alacsonyabb patológiai súlyosságú elváltozásokat igazolt a 7. és 14. napon egyaránt. Az Nkx2-3-hiányos egerek enyhébb gyulladásos jellemzőivel ellentétben a MAdCAM-1 mutánsok súlyosabb lefolyású bélgyulladás jellemzőit mutatták a kontrollokhoz hasonlítva (**6.49. ábra**).

Miután az Nkx2-3 és MAdCAM-1 mutánsok vastagbél nyálkahártyája PNAd-pozitív ereket tartalmaz, ugyanakkor az egerek különböző módon reagálnak a DSS kezelésre, eredményeink alapján feltételezhető, hogy ez az addresszin-váltás, mint közös tulajdonság felelős az éretlen SILT összetevők dominanciájáért, ugyanakkor a MAdCAM-1 transzkripcionális hiánya nem magyarázza a bélgyulladás elmaradását az Nkx2-3 mutánsokban.

6.9.3. Az Nkx2-3 hiánya megváltoztatja a vastagbél RORγt⁺ limfoid sejt és regulátor T-sejt megoszlását és jellemző citokin-termelődését

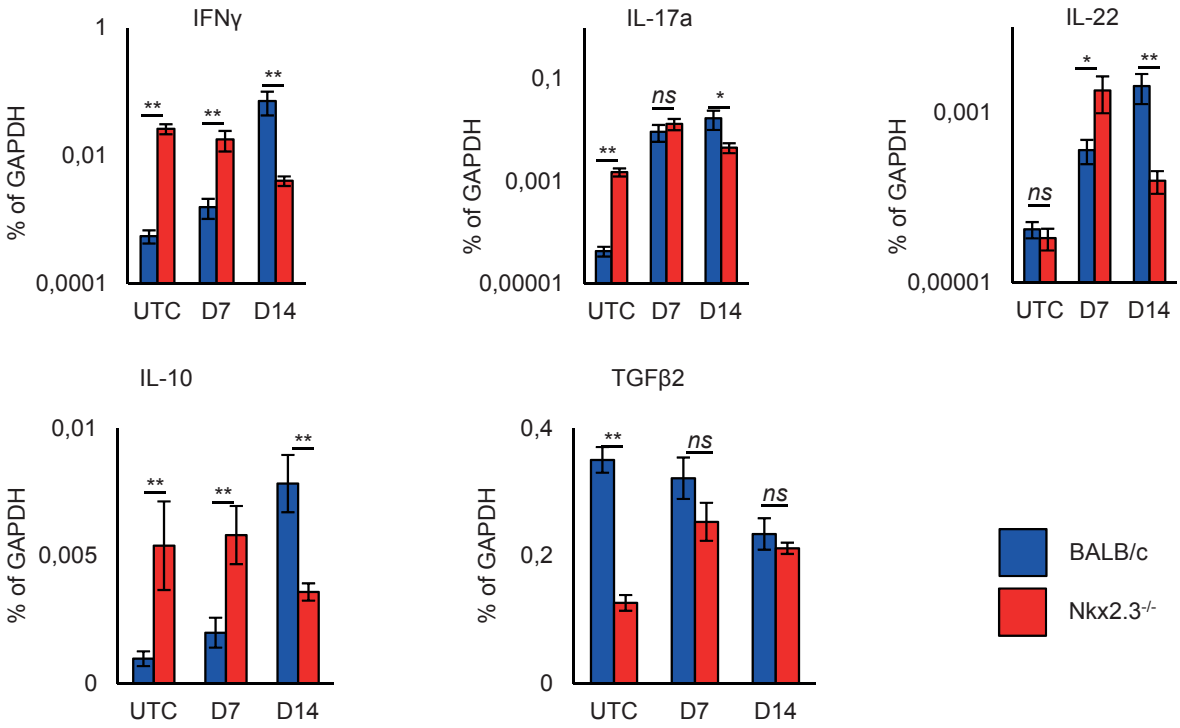
Számos humán és állatkísérletes eredmény igazolja a RORγt⁺ sejtek (CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺/RORγt⁺ Th17 és CD45⁺/CD3⁻/RORγt⁺ ILC3 sejtek), valamint a CD3⁺/CD4⁺/FoxP3⁺/CD25⁺ regulátor T-sejtek (T_{regs}) közötti egyensúly felborulását bélgyulladásban (Ito és mtsai, 2008; Boden és mtsai, 2008; Geremia és mtsai, 2011). Ezért vizsgálatainkat kiterjesztettük a RORγt⁺ limfoid sejtek és T_{reg} alcsoport elemzésére is. Áramlási citometriával az Nkx2-3 mutáns egerek vastagbelében a BALB/c kontrollokhoz hasonlítva szignifikánsan emelkedett gyakoriságú és abszolút számú RORγt⁺ Th17 és ILC3 alcsoportokat detektáltunk. Az ILC3 alcsoportok részletesebb vizsgálata kimutatta a CCR6⁺/RORγt⁺/CD3⁻ sejtek szignifikánsan emelkedett számát, ugyanakkor a Nkp46⁺/RORγt⁺/CD3⁻ ILC3 alcsoport száma csökkent a vad típusú mintához viszonyítva. Emellett az Nkx2-3 hiányos egerekben a CD3⁺/CD4⁺/FoxP3⁺/CD25⁺ T_{reg} sejt gyakorisága és abszolút száma szignifikánsan magasabb volt, mint a BALB/c kontrolloké a gyulladás 7. napján (**6.50. ábra**).

A munkánk következő szakaszában az ILC3 sejtekre, Th17 sejtekre és T_{reg} alcsoportokra jellemző citokinek mRNS kifejeződését vizsgáltuk qPCR eljárással. Adataink szerint az ILC3 és Th17-re jellemző IFNγ és IL-17a (Liang és mtsai, 2006; Takatori és mtsai, 2009) szintje a kezeletlen Nkx2-3-hiányos egerekben szignifikánsan magasabb volt a BALB/c kontrollokhoz hasonlítva.



6.50. ábra: Az Nkx2-3 hiányának hatása a vastagbél RORγt⁺ sejtek és Treg limfociták megoszlására DSS-indukált bélgyulladás során

A diagramok a kezeletlen (UTC) egerekhez viszonyítva BALB/c és Nkx2.3$^{-/-}$ egerekben a CD45⁺ limfoid sejteken belüli gyakoriságot és a vastagbél össz- RORγt⁺ limfocita, valamint Treg számot ábrázolják (n = 5-8 állat/genotípus/csoport, átlag ± SEM, *p < 0,05, **p < 0,005, D7, 7. nap, D14, 14. nap; ns, nem szignifikáns). *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*



6.51. ábra: Az Nkx2-3 hiányának hatása a vastagbél citokin-profiljára DSS-indukált bélgyulladás során
A diagramok a jelzett citokinek cDNS felhasználásával végzett meghatározásának real-time qPCR eredményeit mutatják (átlag ± SEM, n = 5–10 állat csoportonként és genotípusonként; *$p < 0,05$, **$p < 0,005$. D7, 7. nap; D14, 14. nap; UTC, kezeletlen kontroll; ns, nem szignifikáns). *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*

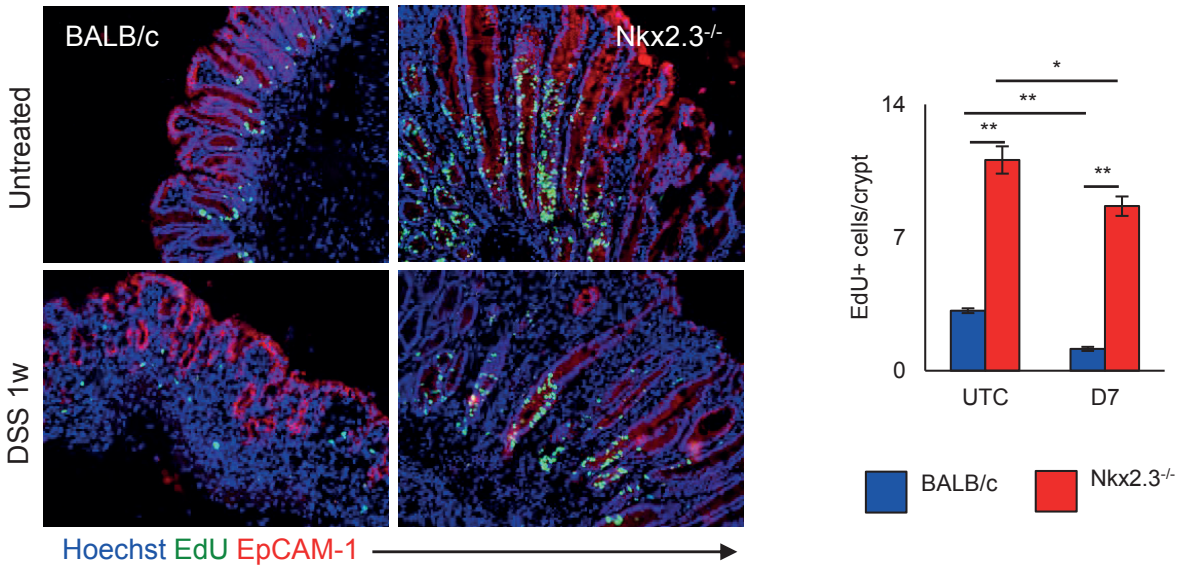
Ugyanakkor ezen citokin mRNS-szintek DSS kezelés hatására az Nkx2-3-hiányos egerekben nem változtak, míg BALB/c egerekben szignifikáns növekedést követően a 14. napon az IFNγ és IL-17a mRNS kifejeződés meghaladta a kezelt Nkx2-3 hiányos egerekben mért szinteket. Ezzel ellentétben az akut bélgyulladás szakaszában (7. nap) az ILC3 és Th17 sejtekre jellemző IL-22 mRNS szintje jelentősen emelkedett Nkx2-3-hiányos egerekben. A krónikus gyulladás időszakára (14. nap) az IL-22 mRNS kifejeződési kinetika megfordult, és a kontroll egerekben magasabb szintet mértünk az Nkx2-3 hiányos egerekhez hasonlítva. A T_{reg} sejtekre jellemző IL-10 mRNS a kezeletlen Nkx2-3 hiányos egerekben magasabb volt, mint a kontrollokban a gyulladás 7. napján, míg a TGFβ2 mRNS kifejeződés a kezeletlen Nkx2-3 mutáns egerekben alacsonyabb volt, és a DSS kezelés során a kontroll egerekhez hasonló kifejeződést mutatott (**6.51. ábra**).

Összefoglalóan ezek a megfigyelések a lamina propria RORγt$^+$ limfocita-összetétel megváltozását, és az IFNγ, IL-17a és IL-22 citokin mRNS-mintázat eltéréseit igazolják Nkx2-3 hiányos egerekben.

6.9.4. Az Nkx2-3 hiányos egerek DSS-indukált bélgyulladástól való védettsége a bélhám-sejtek IL-22 termeléstől független fokozott osztódásához kapcsolódik

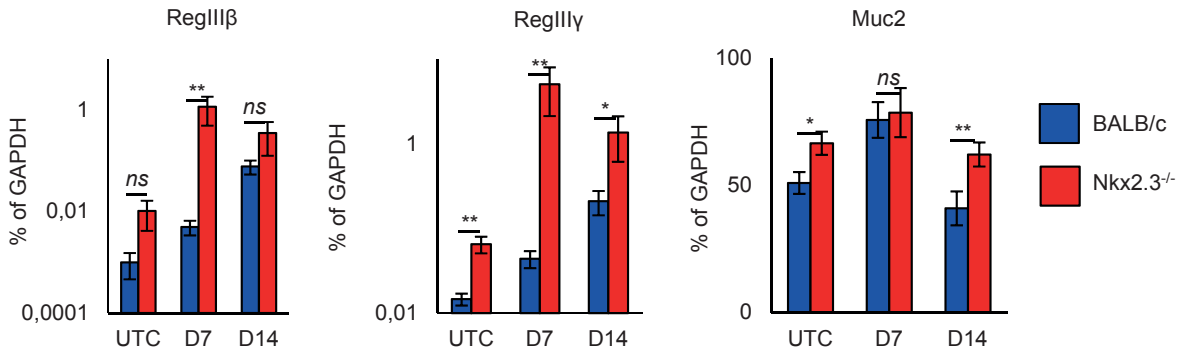
Az Nkx2-3 hiányos egerek vastagbelében a bélhám DSS-indukálta gyulladással szembeni védettségének további elemeként felmerült a bélhám sejtek fokozott osztódási és regenerációs képessége, amit EdU inkorporációs fluoreszcens festési módszerrel vizsgáltunk. Ennek során szignifikánsan emelkedett osztódási arányt észleltünk kezeletlen Nkx2-3 mutáns vastagbél hámsejtekben. Bár DSS kezelés hatására az osztódási arány mindkét genotípusban csökkent a kezeletlen mintákhoz hasonlítva, az Nkx2-3 hiányos állatok osztódási aktivitása szignifikánsan meghaladta a BALB/c kontrollokét. Érdekes módon BALB/c egerekben a legtöbb EdU^+ sejt a kripták alján helyezkedett el, ugyanakkor az Nkx2-3 hiányos egerekben a kripták egész hosszában megjelentek (**6.52. ábra**).

Az IL-22 egy jelentős mukózális hám-protektív faktor, a hatását a heterotrimer IL-22 receptorhoz (IL-22R) kapcsolódva fejti ki, ami a hámsejtek újdonképződését elősegítő Reg család és mucinok termelődés-fokozódásához vezet (Zheng és mtsai, 2008; Pickert és mtsai, 2009). Az IL-22R a bélhám őssejteken (ISC – intestinal stem cells) is kifejeződik, és ligand-kötést követően elősegíti a nyálkahártya-korrekciót és hámsejt-osztódást (Aparicio-Domingo és mtsai, 2015; Lindemans és mtsai, 2015). Eredményeink szerint Nkx2-3 hiányos egerekben a RegIIIβ és RegIIIγ mRNS szintek a kontroll BALB/c egérhez képest magasabbak. A különbség akut vastagbél-gyulladás során kifejezettebbé vált. A vastagbélben fontos nyákalkotóként működő



6.52. ábra: Fokozott vastagbélhám-regeneráció Nkx2-3 hiányában

A reprezentatív képen az Nkx2-3 hiányos egerekben nyugalmi állapotban és DSS-indukált vastagbélgyulladás során egyaránt a hámsejtek (vörös) fokozott mértékű osztódása figyelhető meg EdU (zöld) eljárással (kék magfestés) BALB/c egérhez hasonlítva. Az oszlopdiagramok az EdU jelölődés kvantitatív értékelését mutatják az EdU^+ sejtek kriptánkénti meghatározásával ($n = 5$ állat genotípusonként és csoportonként; átlag ± SEM, $*p < 0{,}05$, $**p < 0{,}005$. D7, 7. nap; UTC, kezeletlen kontroll). *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*



6.53. ábra: Az Nkx2-3 hiányának hatása a vastagbél protektív nyák-faktorainak mRNS kifejeződésére
A diagramok a jelzett faktorok (RegIIIβ, regulin IIIβ; RegIIIγ, Regulin IIIγ; Muc2, Mucin 2) cDNS felhasználásával végzett meghatározásának real-time qPCR eredményeit mutatják (átlag ± SEM, n = 5–10 állat csoportonként és genotípusonként; *$p < 0,05$, **$p < 0,005$. D7, 7. nap; D14, 14. nap; UTC, kezeletlen kontroll; ns, nem szignifikáns). *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*

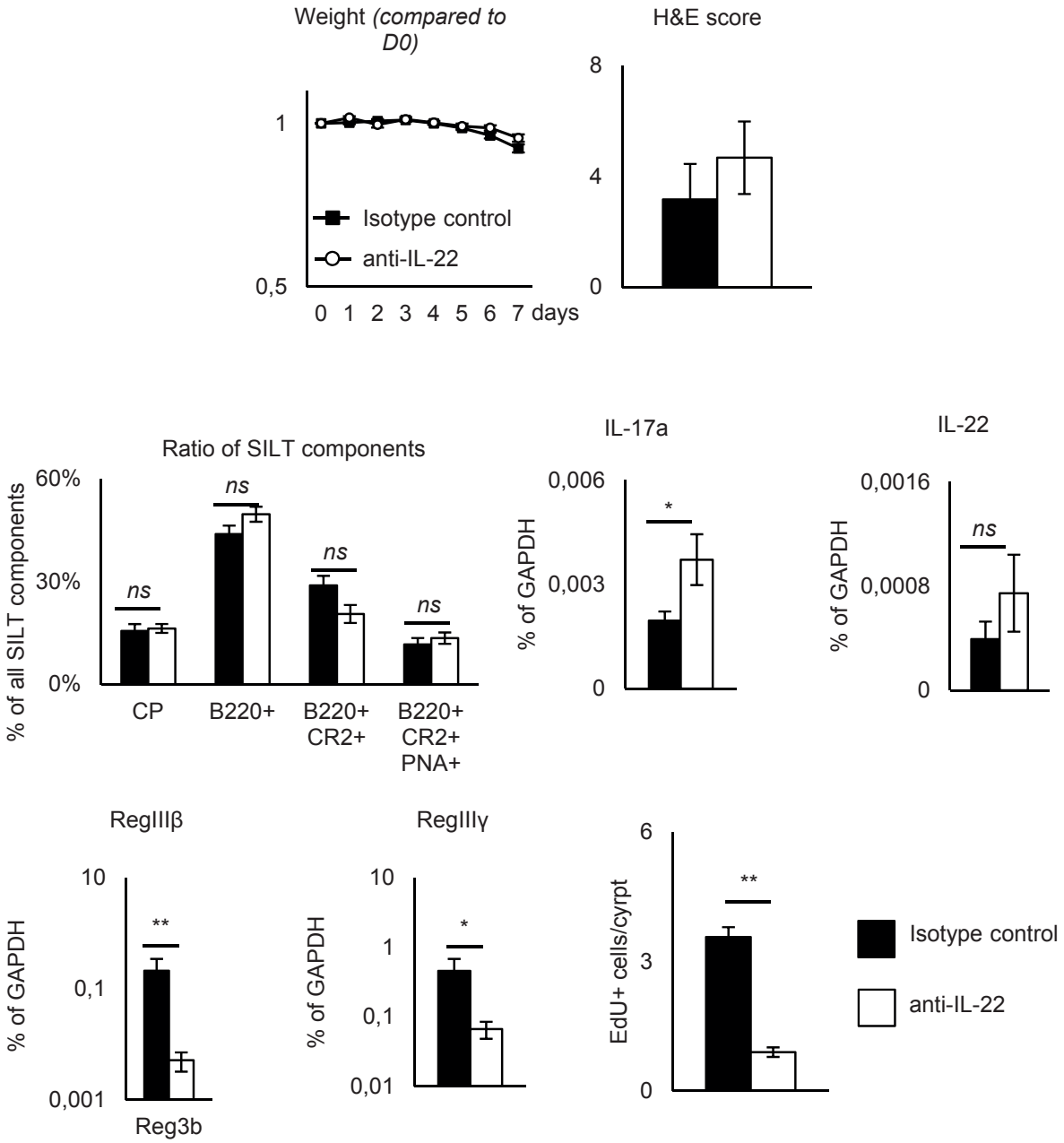
Muc2 (Van der Sluis és mtsai, 2006) mRNS szintje kezeletlen Nkx2-3 hiányos egérben magasabb volt, mint a kontroll BALB/c mintákban, de az akut gyulladás nem változtatta meg ezt a szintet (**6.53. ábra**).

Az Nkx2-3 hiányos egerek DSS-indukálta bélgyulladással szembeni védettségében az IL-22 protektív szerepének vizsgálatára a 7 napos DSS-kezelés során az egereket antagonista anti-IL-22 antitesttel oltottuk. Az IL-22 antitest-közvetített gátlása nem súlyosbította a bélgyulladás tüneteit. A vastagbél Swiss Roll gyulladásos szövettani értékelése és SILT spektrum összetétele sem mutatott különbséget a kontroll ellenanyag kezeléshez hasonlítva. Az anti-IL-22 és kontroll antitest-kezelt csoportban a T_H17 és ILC3 sejtek abszolút száma és relatív aránya nem különbözött. Az IL-17a mRNS az anti-IL-22 kezelést kapott csoportban szignifikánsan magasabb volt, az IFNγ és IL-22 nem különbözött. Az anti-IL-22 antitest általi biológiailag hatékony citokin-gátlást az anti-IL-22 kezelt csoportban a RegIIIβ és RegIIIγ mRNS szignifikáns csökkenése jelezte, amivel párhuzamosan ezekben a mintákban a vastagbél hámsejtjeinek osztódása is szignifikánsan csökkent (**6.54. ábra**).

Ezek az eredmények azt igazolják, hogy ugyan az IL-22 fokozott termelődése elősegítheti Nkx2-3 mutáns egerekben a vastagbélhám erőteljesebb gyógyulását, az antitest-közvetítette gátlása nem súlyosbítja a gyulladás mértékét.

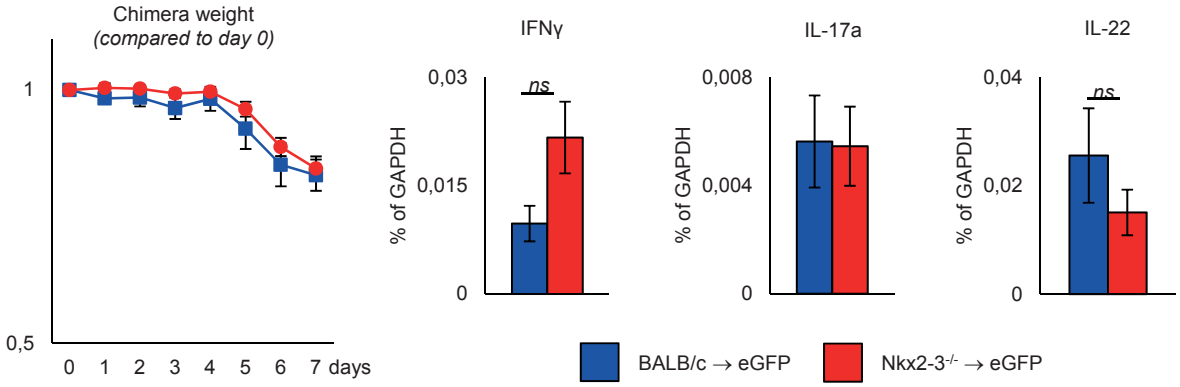
6.9.5. Nkx2-3 hiányos egerek vastagbélgyulladással szembeni védelmét a nem-hematopoetikus sejtek közvetítik

Az Nkx2-3 egerekben észlelt eltérő citokin-mintázat limfoid vagy stromális eredetének jobb megítélésére csontvelő kimérákat hoztunk létre. 4 hetes eGFP-Tg-BALB/c egerek vérképzését letális besugárzásukat követően Nkx2-3 hiányos vagy vad típusú BALB/c csontvelő sejtekkel rekonstruáltuk. A transzplantáció utáni 5. héttől a kiméra egerekben 2,5% DSS víz itatásával bélgyulladást indukáltunk, majd a 14. napon az állatokat terminálták. Az eltérő donorokkal



6.54. ábra: Az IL-22 gátlásának hatása az Nkx2-3$^{-/-}$ egerek gyulladásos jellemzőire DSS-indukált vastagbélgyulladás során

Az ábra a DSS-kezelés után anti-IL22 illetve kontroll IgG-vel kezelt Nkx2-3$^{-/-}$ egerek naponkénti testsúlyát, kórszövettani értékeit, SILT-összetevőik megoszlását, az IL-17a és IL-22, valamint Reg molekulák mRNS expresszióját és az EdU^{+} osztódó sejt gyakoriságát mutatja. Az anti-IL-22 antitest-kezelt mintákat az üres, az izotípus-kontroll antitesttel kezelt egerek mintáit a fekete oszlopok jelzik. Az adatok az átlag ± SEM értékeket mutatják (n = 12 egér csoportonként, ; *p < 0,05, **p < 0,005. D7, 7. nap; D14, 14. nap; UTC, kezeletlen kontroll; ns, nem szignifikáns). *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*

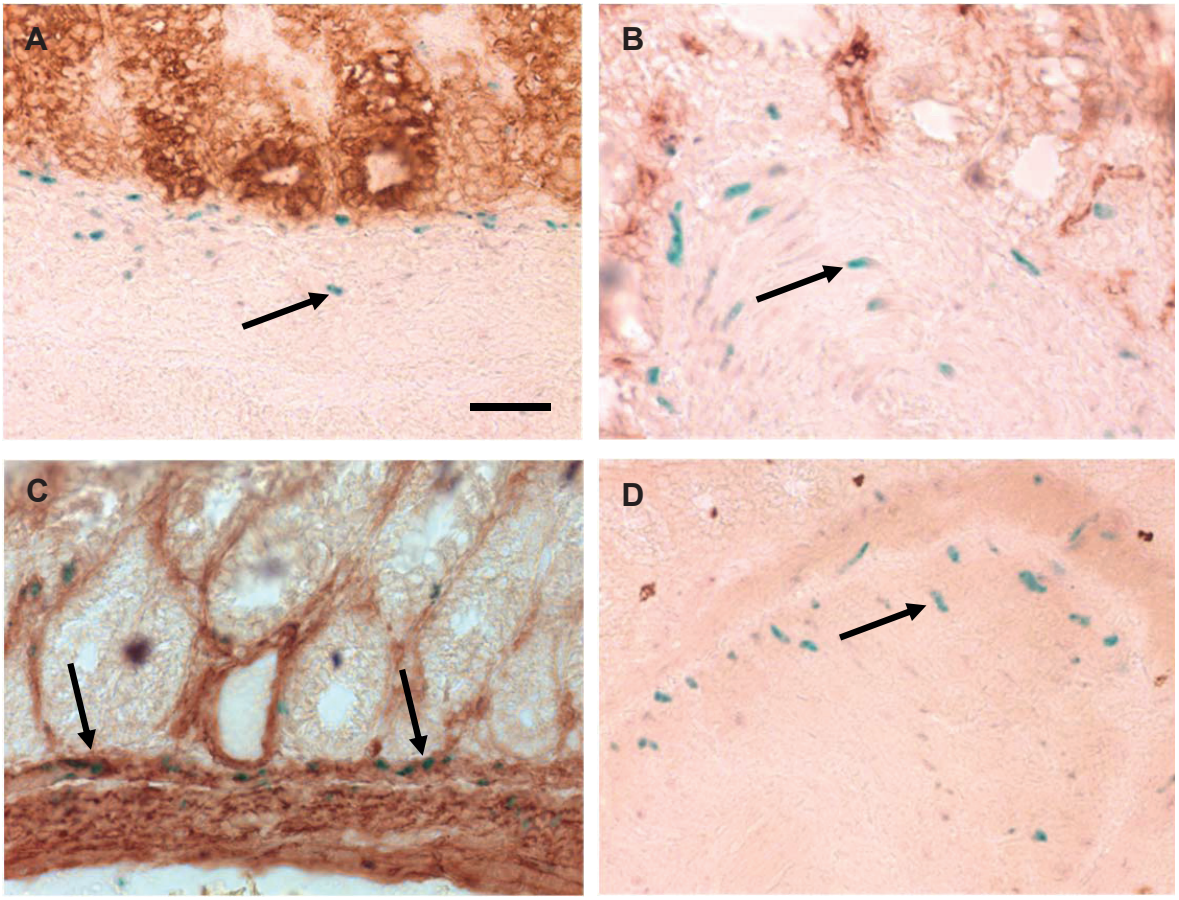


6.55. ábra: A nem-hematopoetikus sejtek szerepe a vastagbélgyulladás mérséklésében Nkx2.3 hiányos egérben
A diagramok a BALB/c → eGFP és Nkx2.3$^{-/-}$ → eGFP kimérák 2,5%-os DSS-tartalmú víz hatására bekövetkező súlyvesztését és a gyulladás során mért citokin mRNS expresszió cDNS real-time qPCR eredményeit mutatják (*$p <$ 0,05, **$p <$ 0,005; ns, nem szignifikáns, n = 5 állat csoportonként). *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*

rekonstruált egerek között nem volt különbség a súlycsökkenésben és a vastagbélgyulladás egyéb fizikális paramétereiben (**6.55. ábra**). Ezen adatok szerint az Nkx2-3 faktor hematopoetikus sejtekre korlátozódó hiánya nem befolyásolja a vastagbélgyulladás lefolyását, ami felvetette a transzkripciós faktor stromális sejtek általi termelődésének a protektív hatását.

A vastagbél Nkx2-3-expresszáló nem-hematopoetikus sejtjeinek azonosítására LacZ-Nkx2-3 heterozigóta egereket használtunk (Wang és mtsai, 2000). X-gal enzimcitokémiával kombinált immunhisztokémiai eljárással nem találtunk a vastagbél EpCAM-1^{+} hámsejtjeiben illetve az IBL-20 antitesttel azonosított endotél-sejtekben LacZ aktivitást. Ugyanakkor erőteljes nukleáris LacZ szignált tudtunk kimutatni a vastagbél tunica muscularis mucosae rétegében elhelyezkedő miofibroblaszt morfológiájú és VAP-1 (vascular adhesion protein-1) markert kifejező sejtekben (**6.56. ábra**), a humán Nkx2-3 kifejeződést leíró eredményhez hasonlóan (Hsia és mtsai, 2016).

A fenti adatok alapján a vastagbél-gyulladással szemben az Nkx2-3 hiányában megfigyelt protektív hatás a tunica muscularis mucosae rétegben elhelyezkedő VAP-1-pozitív, nem-hematopoetikus sejtekkel hozható összefüggésbe.



6.56. ábra: Az Nkx2-3 kifejeződése a vastagbélben LacZ és immunhisztokémiai kettős jelöléssel

A reprezentatív képek LacZ-Nkx2.3$^{+/-}$ riporter egerek vastagbeléből készült metszetek anti-EpCAM (**A**), anti-endotél IBL-20 (**B**), anti–VAP-1 (**C**) és izotípus kontroll IgG (D) HRP anti-patkány IgG immunhisztokémiai (H_2O_2-DAB, barna reakciótermék) és X-gal (kék reakciótermék, nyilak) enzimcitokémiai reakcióját mutatják (n = 5 egér). Lépték: 100µm. *Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.*

6.10. Az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor szerepe a 3. típusú veleszületett limfoid sejtek (ILC3) posztnatális sejtmegoszlásának szabályozásában a bél-asszociált nyirokszövetekben

A bél-asszociált nyirokszövetek szerteágazó fejlődésű és szerkezetű tagjai kiterjedt és komplex hálózatot alkotnak. A bél programozott nyirokszöveti komponenseinek – a vékonybél Peyer plakkjainak (PP) és vastagbél plakkjainak (ColP) – a fejlődése az embrionális időszakban kezdődik. Érett formában ezek a szövetek a szekunder nyirokszövetekre jellemző elkülönült T- és B-sejtes régiókból épülnek fel. Ezzel ellentétben a kriptoplakkok (CP) és a belőlük kialakuló nyiroktüszők (ILF) a születést követően környezeti hatások és a táplálékkal bekerülő anyagok által „instruált" módon, és T-sejt zóna képződése nélkül fejlődnek ki. Gyulladásos körülmények hatására az ILF járulékos T-sejt zóna megjelenésével harmadlagos nyirokszövetté transzformálódhat (Buettner és Lochner, 2016).

A fejlődéstani és szerkezeti különbségeik ellenére a PP és CP/ILF formációk kialakulásában számos közös fejlődési és sejtközötti kommunikációs hasonlóság áll fenn. Így mind a PP prenatális indukciójában és korai fejlődésében, mind a vastagbél CP/ILF megjelenésében fontos szerepe van a c-kit$^+$, IL-7Rα$^+$, CD45$^+$ és α4β7 integrin$^+$, CD3$^-$/CD19$^-$ fenotípus alapján azonosított limfoid szövet-indukáló (LTi) sejteknek (Mebius, 2013). Ezek a RORγt$^+$ sejtek a 3. típusú veleszületett limfoid sejtek (ILC3) csoportjába tartoznak (Mebius és mtsai, 1996; Eberl és mtsai, 2003).

A PP-kezdeményben zajló későbbi szövet-specifikus limfocita-megtelepedésében a bélnyálkahártya MAdCAM-1 addresszin α4β7 integrin általi felismerése fontos szerepet tölt be (Adachi és mtsai, 1997; Hashi és mtsai, 2001). A fentiekhez hasonlóan a vastagbél ILF képződése a felnőtt LTi-analóg ILC3 sejtjeit tartalmazó CP struktúra fokozatos átalakulásával kezdődik, és a SILT (solitary intestinal lymphoid tissues) különböző érettségű formáit hozza létre (Ivanov és mtsai, 2006).

A MAdCAM-1 addresszin egyik fontos szövet-specifikus szabályozója az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor (Pabst és mtsai, 2000). Bár egérben az Nkx2-3 hiányában a MAdCAM-1 addresszin embrionális kifejeződése megmarad, születést követően viszont az endotél sejtekről fokozatosan elveszik, míg a PP follikuláris stromális sejtjein továbbra is fennmarad, ami az Nkx2-3 sejtvonal-szelektív és időben korlátozott szabályzó szerepére utal (Wang és mtsai, 2000). Emberben az Nkx2-3 a vastagbél és végbél őssejt-fészek szabályozásában a helyi miofibroblaszt-identitás fenntartásán keresztül vehet részt (Hsia és mtsai, 2016). Teljes genom-asszociációs tanulmányokban (GWAS) az Nkx2-3 SNP variánsait a béltraktusban gyakran ektópiás nyirokszövet-képződéssel járó gyulladásos bélbetegségek különböző formáival lehetett társítani (Parkes és mtsai, 2007; Fisher és mtsai, 2018).

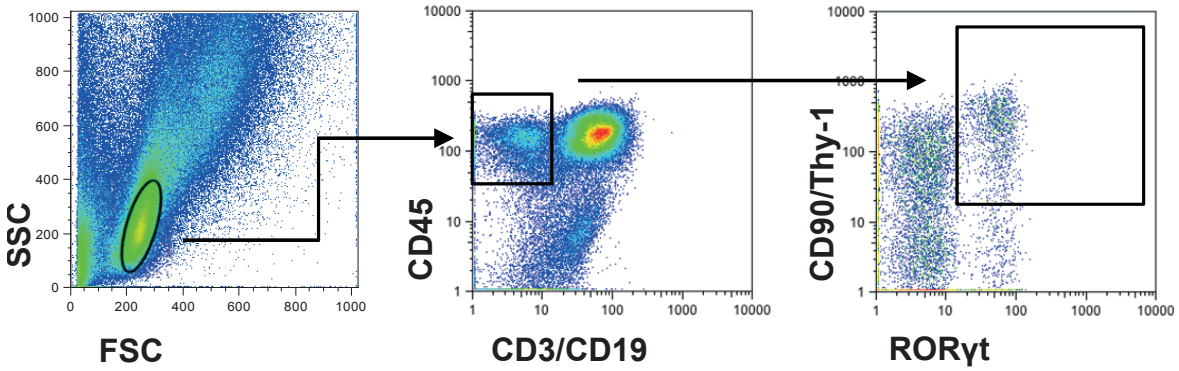
Bár az Nkx2-3 alapvetően fontos a lép és PP normális fejlődésében, a CP/ILF organogenezisben és az ILC3 sejtek bélben történő megoszlásában játszott szerepe jelenleg ismeretlen. A posztnatális SILT képződés során a perifériás limfoid organogenezis számos eseménye megis-

métlődik, ezért feltételezésünk szerint az Nkx2-3 faktornak (mint a MAdCAM-1 transzkripcionális szabályozója) vagy önmagának a MAdCAM-1 addresszinnek a hiánya befolyásolhatja az ILC3 megoszlást és SILT fejlődést. Ezért munkánk következő szakaszában a MAdCAM-1 addresszin két különböző hátterű defektusának az ILC3 sejtek bélben való megoszlására és a posztnatális SILT komponensek fejlődésére kifejtett hatását vizsgáltuk (Vojkovics és mtsai, 2019).

6.10.1. Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányban megváltozik a születés utáni ILC3 megoszlás a bélben

Bár az Nkx2-3 hiánya az endoteliális MAdCAM-1-expresszió transzkripcionális gátlását okozza (Pabst és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 2000), korábbi munkánk eredményei szerint az Nkx2-3 és a MAdCAM-1 genomiális hiánya fiatal felnőtt egerekben eltérő módon érinti a vastagbél lamina propria ILC3 megoszlását, amennyiben Nkx2-3 mutánsokban az ILC3 szám magasabb, a MAdCAM-1 hiányos egerekben szignifikánsan alacsonyabb volt (Kellermayer és mtsai, 2019). Ebben a munkánkban először ennek a két különböző mechanizmusú MAdCAM-1 hiánynak az ILC3 sejtek megoszlására kifejtett hatását vizsgáltuk a teljes béltraktus mentén. A különböző posztnatális korban vett bélmintákban az ILC3 sejteket azok $CD45^{+}C3^{-}CD19^{-}CD90^{+}ROR\gamma t^{+}$ fenotípusa alapján határoztuk meg áramlási citometriával (**6.57. ábra**).

A vékonybélben az ILC3 sejtek (siILC3) száma minden egértörzsben és minden vizsgált időpontban magasabb volt, mint a vastagbélben (cILC3). A siILC3 sejtek az első posztnatális héten voltak jelen a legnagyobb számban, és ebben az időpontban nem találtunk szignifikáns különbséget az Nkx2-3 hiányos és heterozigóta egér között. A MAdCAM-1 mutáns egerekben jelentékenyen alacsonyabb számú siILC3 sejtet találtunk az Nkx2-3 hiányos egerekhez hasonlítva, de itt sem volt különbség a MAdCAM-1 hiányos egerekhez és a releváns vad típusú C57BL/6 kontrollhoz hasonlítva.



6.57. ábra: A vékonybél ILC3 sejtjeinek áramlási citometriás azonosításához használt kapuzási stratégia
A nagyság/komplexitás (FSC/SSC) alapján kiválasztott limfoid kapu (bal) és a CD3/CD19 markerekkel szemben a $CD45^{+}$ alcsoport (középső) után a kombinált kapun belül a CD90/RORγt kettős pozitív sejteket (jobb) tekintettük ILC3 sejteknek (reprezentatív ábra egy 4 hetes C57Bl/6 egér vékonybeléből). *Vojkovics D, Kellermayer Z, Gábris F, Schippers A, Wagner N, Berta G, Farkas K, Balogh P. 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.*

A második posztnatális héten a siILC száma mindegyik egértörzsben jelentősen csökkent. A legmagasabb siILC3 sejtszámot az Nkx2-3 mutánsban, míg a legalacsonyabb számot a MAdCAM-1 mutánsban találtuk.

A negyedik posztnatális hétre a siILC3 szám - a második hetihez képest mérsékelt emelkedést mutató C57BL/6 kivételével - minden vizsgált egértörzsben szignifikánsan csökkent. Az Nkx2-3 mutáns egerekben a siILC3 sejtszám szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a heterozigóta kontrollokban. A siILC3 szám a MAdCAM-1 mutánsokban volt minden mérési időpontban a legalacsonyabb, és ezekben az egerekben a siILC3 és cILC3 sejtek száma folyamatosan csökkent a negyedik posztnatális hétig.

A vastagbélben a cILC3 szám a születés utáni első héten az Nkx2-3 heterozigótákban, C57BL/6 vad típusú kontrollokban és az Nkx2-3 mutánsokban hasonló volt. A MAdCAM-1 mutánsban ezek a sejtek jóval kisebb számban fordultak elő.

A második posztnatális héten a cILC3 szám négyszeres emelkedést mutatott az Nkx2-3 mutánsokban és heterozigótákban, míg a MAdCAM-1 mutánsokban és a C57BL/6 kontrollban tovább csökkent.

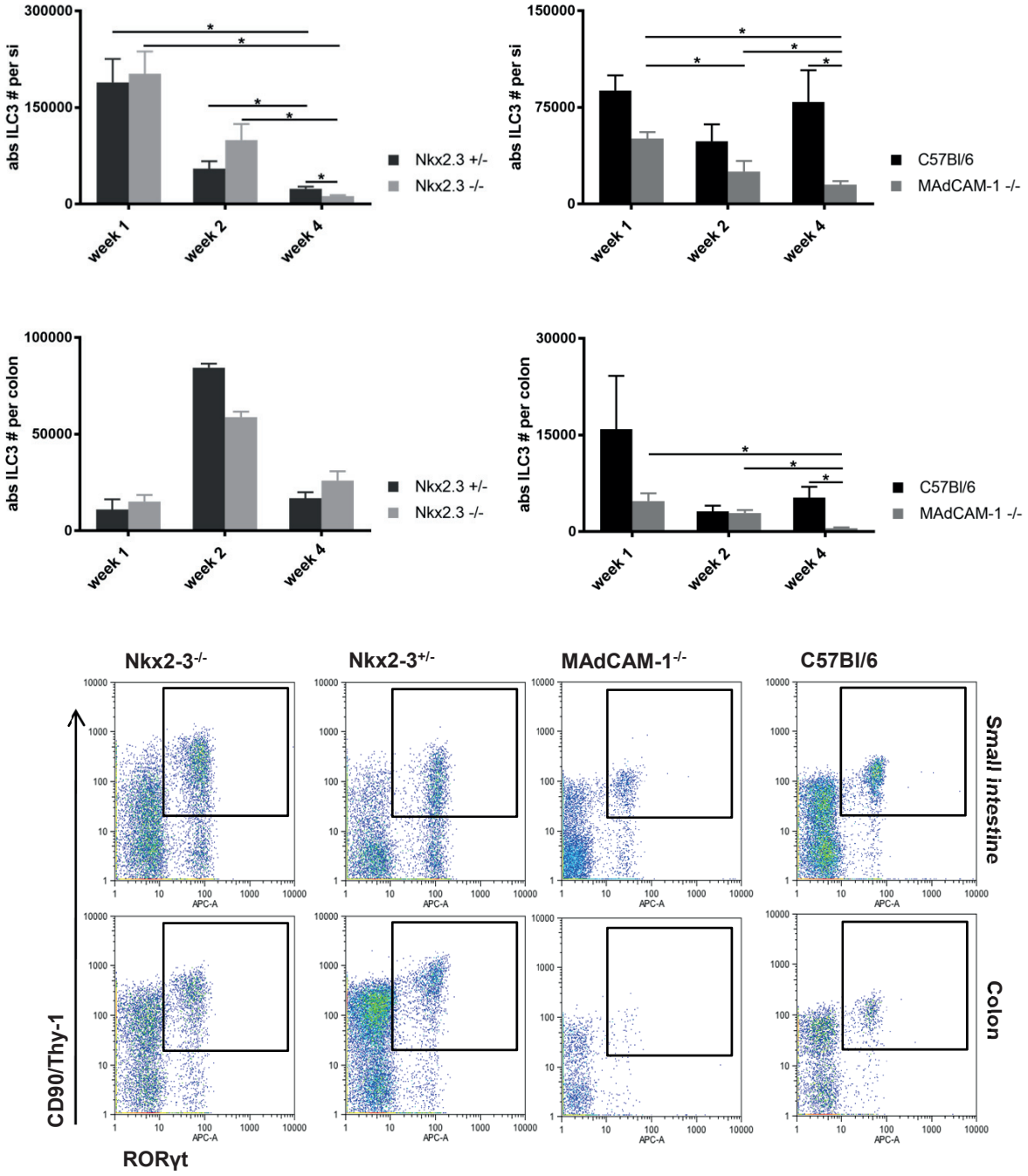
A negyedik posztnatális hétre az Nkx2-3 heterozigóta és Nkx2-3 mutáns egerek cILC3 száma nagymértékben csökkent, bár az első hetinél magasabb volt. A siILC3 számmal ellentétben Nkx2-3 mutáns mintákban a negyedik heti cILC3 számot kissé magasabbnak találtuk. A MAdCAM-1 mutánsokban a cILC3 sejtek szinte kimutathatatlanok voltak, míg a C57BL/6 egerekben az első hetihez hasonló számban voltak jelen. A posztnatális ILC3 megoszlási kinetikát és a 4. héten jellemző ILC3 gyakoriságot a vékonybélben és a vastagbélben az egyes vizsgált egértörzsekben a **6.58. ábra** mutatja.

Ezen eredmények alapján a MAdCAM-1 különböző formájú hiánya eltérő módon befolyásolja a bélcsatorna mentén az ILC3 sejtek megoszlását, ahol a MAdCAM-1 genomiális hiánya okozza a legsúlyosabb eltérést a vékonybélben és a vastagbélben egyaránt.

6.10.2. A SILT érésének eltérései Nkx2-3 és MAdCAM-1 hiányában

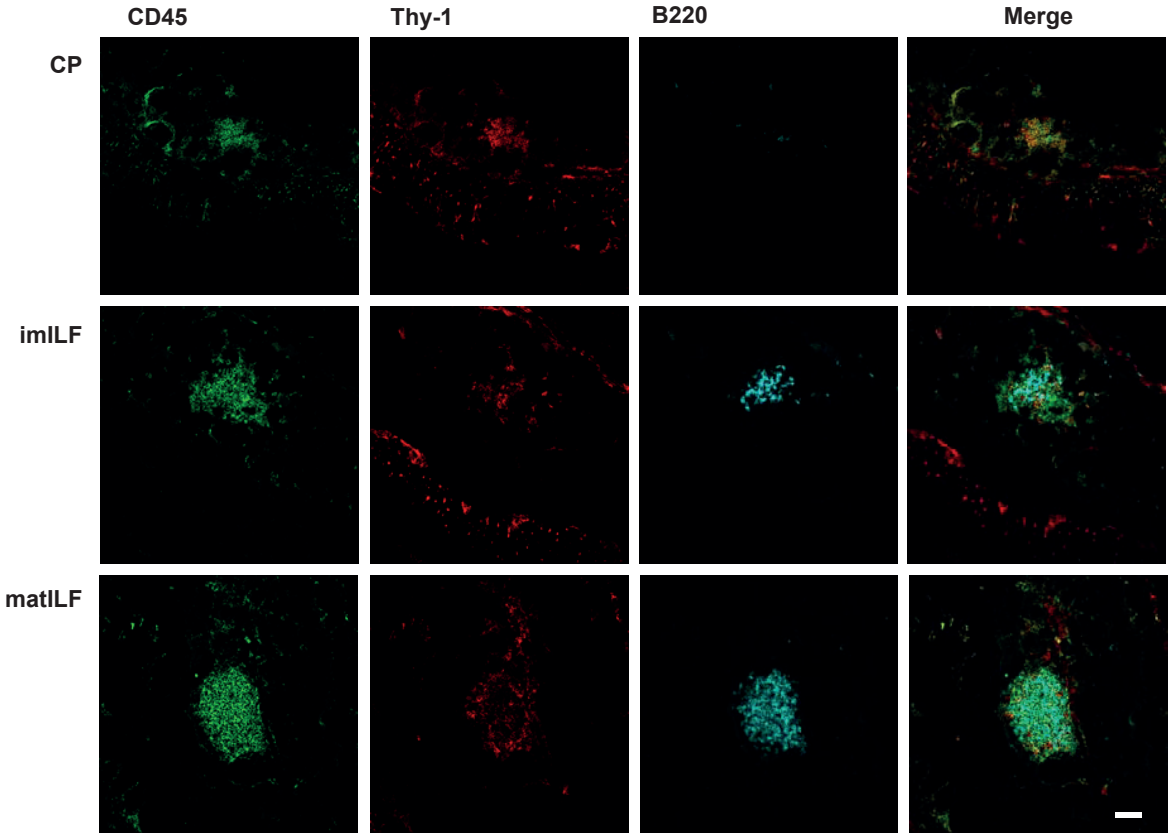
Korábbi eredményeink szerint a PP-ban az Nkx2-3 hiányában fellépő limfocita-összetétel eltéréseihez a fiatal felnőtt egérben az érmintázat megváltozása kapcsolódik, amely során a MAdCAM-1 addresszint a nyirokcsomókra jellemző PNAd helyettesíti (Kellermayer és mtsai, 2014). Ennek az eltérésnek a SILT fejlődésre gyakorolt hatását a posztnatális időszak első heteiben az Nkx2-3 és MAdCAM-1 mutánsokban, valamint vad típusú kontrollokban a különböző érési formák meghatározásával vizsgáltuk. Az azonos mikrokörnyezeti állapotok biztosításához az Nkx2-3 mutánsok esetében az ugyanazon ellésből származó heterozigóta egyedeket tekintettük vad típusú kontrollnak.

A SILT komponenseket a jellemző sejtalkotókat azonosító többszörös immunfluoreszcens jelöléssel és az egyes képletek szerkezeti tulajdonságai alapján azonosítottuk. Az érett ILF (matILF) variánsok nagy méretűek és gyakran tartalmaznak $B220^+$ csíracentrumot, míg az éretlen



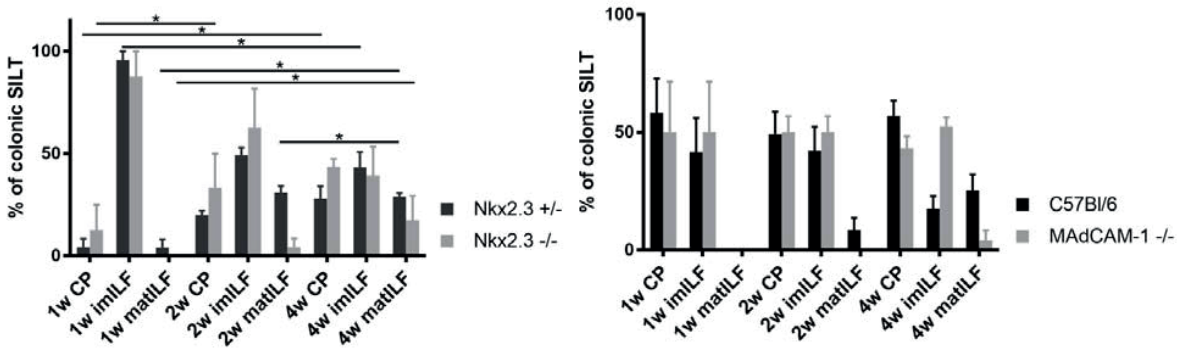
6.58. ábra: A MAdCAM-1 addresszin transzkripcionális (Nkx2-3$^{-/-}$) és genomiális (MAdCAM-1$^{-/-}$) hiányának hatása az ILC3 sejtek posztnatális megoszlására a vékonybélben és vastagbélben

Az oszlopdiagramok az Nkx2-3 homozigóta és kontroll heterozigóta deficiens, valamint MAdCAM-1 homozigóta deficiens és C57Bl/6 kontroll egér vékonybél (si) és vastagbél ILC3 abszolút számot mutatják a jelzett életkorokban (n = 3–7, átlag ± SEM, *p < 0,05). Az alsó sűrűség-plotok 4 hetes korban ábrázolják a jelzés szerinti genotípusú állatokból származó reprezentatív mintákon a vékonybél (felső sor) és a vastagbél (alsó sor) ILC3 sejtek megjelenését. *Vojkovics D, Kellermayer Z, Gábris F, Schippers A, Wagner N, Berta G, Farkas K, Balogh P. 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.*



6.59. ábra: A posztnatális vastagbél SILT komponenseinek jellemző szerkezete

A kriptoplakk (CP), éretlen izolált nyiroktüsző (imILF) és érett izolált nyiroktüsző (matILF) jellemző megjelenése reprezentatív képen 4 hetes Nkx2-3$^{+/-}$ mintában az alkalmazott CD45/Thy-1/B220 hármas immunfluoreszcens jelöléssel fagyasztott „Swiss roll" metszeteken. Lépték= 100 µm. *Vojkovics D, Kellermayer Z, Gábris F, Schippers A, Wagner N, Berta G, Farkas K, Balogh P. 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.*



6.60. ábra: A MAdCAM-1 transzkripcionális (Nkx2-3$^{-/-}$) és genomiális (MAdCAM-1$^{-/-}$) hiányának hatása a SILT érésre

A diagramok a különböző SILT komponensek előfordulását mutatják Nkx2-3$^{+/-}$ (fekete oszlopok) és Nkx2-3$^{-/-}$ (szürke oszlopok) (bal), valamint C57BL/6 (fekete oszlopok) és MAdCAM-1$^{-/-}$ (szürke oszlopok) (jobb) genotípusú egerekben a születés utáni 1, 2, és 4 hetes korban (n = 4; átlag ± SEM *p < 0,05). *Vojkovics D, Kellermayer Z, Gábris F, Schippers A, Wagner N, Berta G, Farkas K, Balogh P. 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.*

formák (imILF) kisebbek, kevesebb B-sejtet tartalmaznak és kevésbé kompakt szerkezetűek (**6.59. ábra**). A SILT komponensek különböző genotípusokban meghatározott összetételének statisztikai értékelését a **6.60. ábra** mutatja.

Az első posztnatális héten mindegyik genotípus vastagbelében csak CP és imILF formák voltak jelen, és nem találtunk matILF képleteket. Ezeknek az éretlen SILT formációknak a megoszlása hasonlónak bizonyult a mutánsokban és a megfelelő kontrollban. A CP arány a MAdCAM-1 mutáns és C57BL/6 egerekben magasabb, és kevesebb imILF képletet találtunk, mint a BALB/c alapú Nkx2-3 mutánsokban és a heterozigótákban.

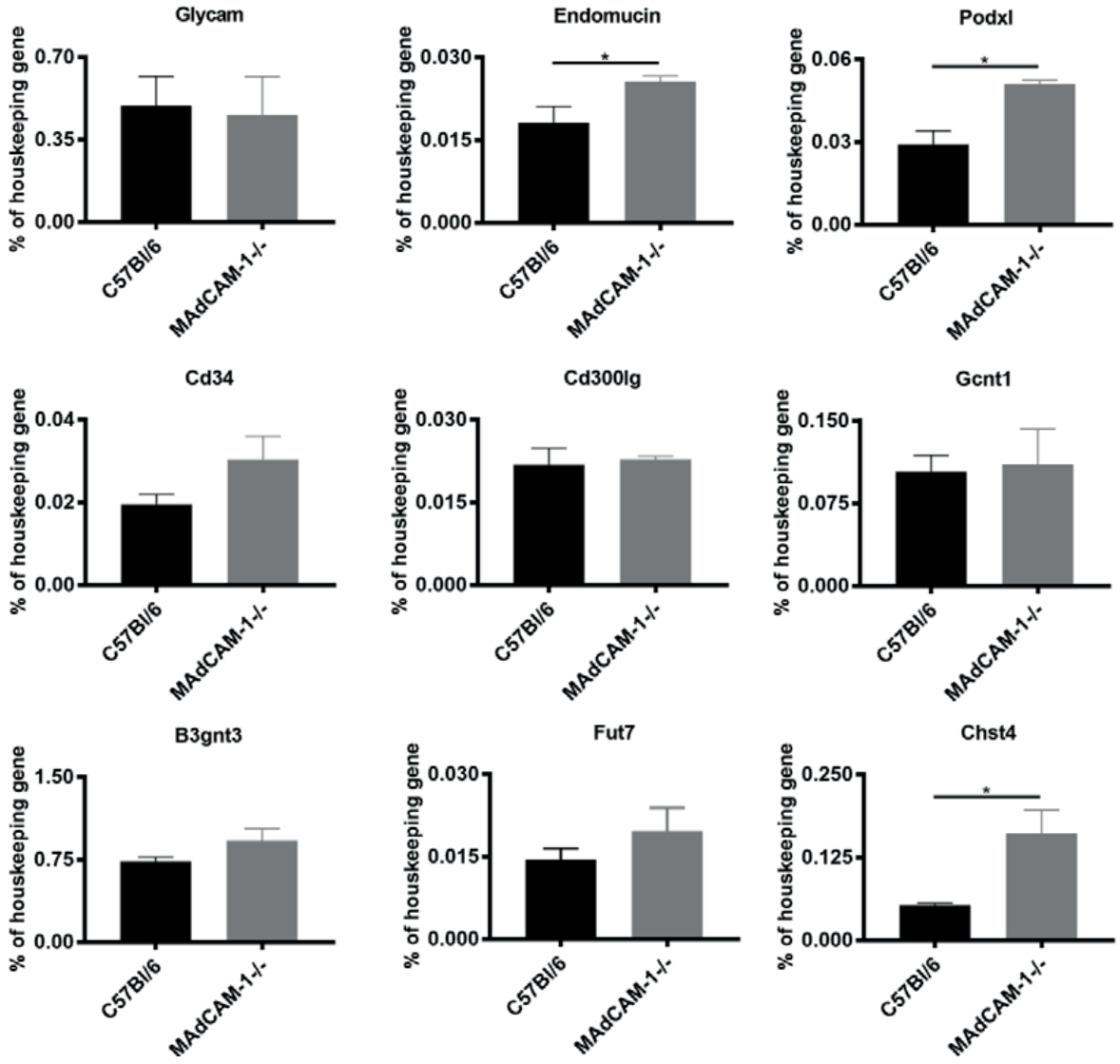
A második posztnatális héten az Nkx2-3 heterozigótákban már nagyobb számban megjelentek a matILF képletek, míg Nkx2-3 mutánsokban elenyésző számban voltak kimutathatók. A MAdCAM-1 mutánsokban nem találtunk matILF képleteket. Az Nkx2-3 mutánsokban és a heterozigótákban nem volt szignifikáns különbség a CP és imILF arányok között, illetve a MAdCAM-1 mutáns és C57BL/6 kontrolljaik között. Az első héthez hasonlóan az Nkx2-3 mutáns és heterozigóta mintákban a CP struktúrák alacsonyabb arányban voltak, mint a C57BL/6 és MAdCAM-1 mutánsokban.

A negyedik héten és mindegyik genotípusban kimutathatóak voltak matILF variánsok. MAdCAM-1 mutáns vastagbélben az arányuk szignifikánsan alacsonyabb volt a vad típusú C57BL/6 kontrollhoz hasonlítva. Az Nkx2-3 mutánsban a matILF alacsonyabb arányban volt jelen, mint a heterozigóta kontrollokban. A MAdCAM-1 mutánsokban a C57BL/6 kontrollhoz hasonlítva az imILF formációk magasabb, a CP alacsonyabb arányban voltak jelen. Az Nkx2.3 mutánsok imILF gyakorisága hasonló volt a heterozigótákhoz, ugyanakkor a CP arány magasabb volt.

Eredményeink alapján a MAdCAM-1 kifejeződésének különböző mechanizmusú hiányállapotai változatos módon befolyásolják a vastagbél SILT kialakulását, ugyanis az Nkx2-3 hiányában a SILT érés kevésbé gátolt a kontrollhoz képest, míg MAdCAM-1 mutánsokban a SILT transzformáció súlyosabb mértékben késleltetett. Ezek az eredmények arra is rávilagítanak, hogy ugyan a különböző típusú MAdCAM-1 hiány késlelteti a vastagbél SILT differenciálódását, de még a teljes (genomiális) MAdCAM-1 hiány sem képes annak megakadályozására.

6.10.3. A PNAd vázfehérjék és modifikáló enzimek mRNS kifejeződése MAdCAM-1 mutáns Peyer plakkokban

A MAdCAM-1 a limfociták Peyer plakkokba (PP) irányuló megtelepedésének elsődleges addresszin molekulája. Tekintettel a különböző PNAd vázfehérjék és módosító enzim mRNS-ének az Nkx2-3 mutációhoz kapcsolódó fokozott kifejeződésére (Kellermayer és mtsai, 2014), munkánk következő szakaszában a MAdCAM-1 mutációban vizsgáltuk hasonló eltérések megjelenését. 8-10 hetes MAdCAM-1 deficiens PP-ból készített cDNS felhasználásával qPCR eljárással a vázfehérjék közül az endomucin és podocalyxin-szerű fehérje fokozott mRNS kifejeződését figyeltük meg, míg a CD45, Glycam1 és nepmucin mRNS mennyisége nem különbözött a kontroll PP mintákhoz hasonlítva szignifikáns mértékben (**6.61. ábra**). A MECA-79



6.61. ábra: A MAdCAM-1$^{-/-}$ mutáció hatása a PNAd vázfehérjék és glikozilációs enzimek mRNS expressziójára a mutáns Peyer-plakkokban

Az oszlopdiagramok a megjelölt vázfehérje célgén (GlyCAM, endomucin, podocalyxin-like protein, CD34, és nepmucin [Cd300lg]) mRNS β-aktinhoz viszonyított mRNS real-time qPCR eljárással mért kifejeződését ábrázolják (n = 6; átlag ± SEM, két párhuzamos mérésben; *$p < 0,05$). *Vojkovics D, Kellermayer Z, Gábris F, Schippers A, Wagner N, Berta G, Farkas K, Balogh P. 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.*

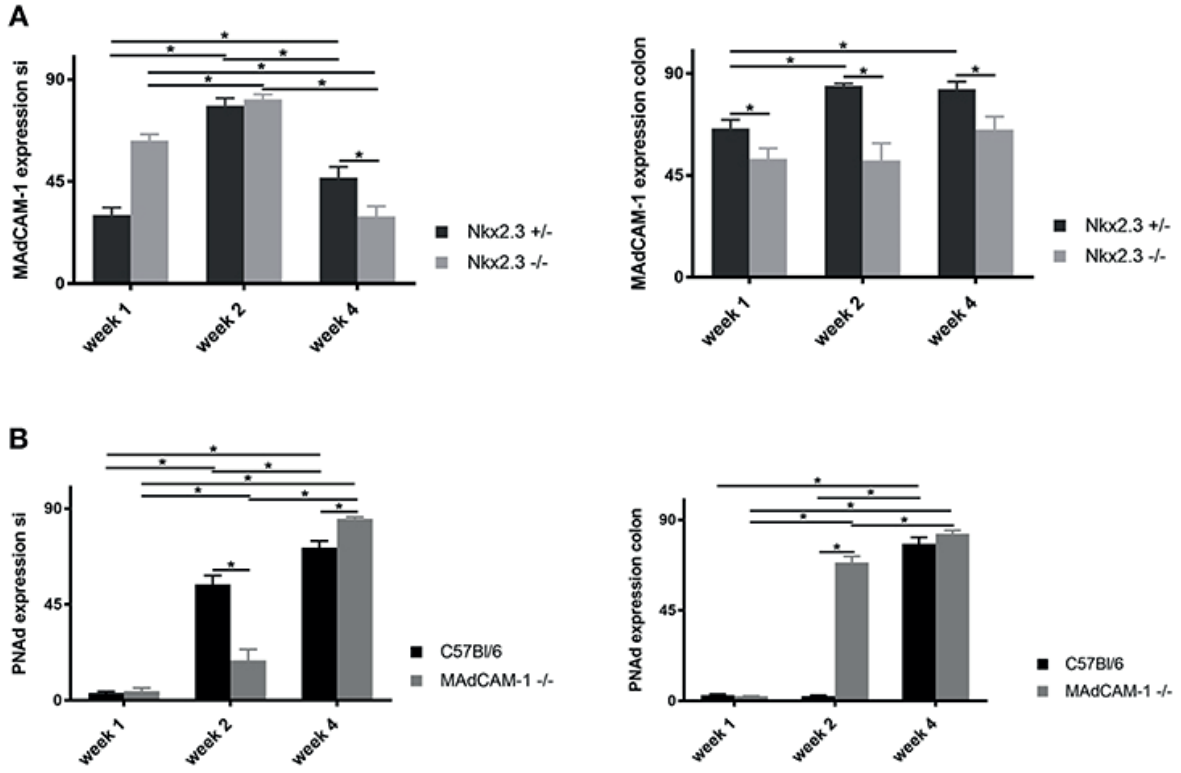
glikoepitóp kialakításában fontos módosító enzimek közül a βGal-β-1,3-N-acetilglukozaminiltranszferáz-3-szulfotranszferáz (B3gnt3) és α-(1,3)-fukoziltranszferáz (Fut7) mRNS nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbségeket, míg az N-acetilglükózamin 6-O szulfotranszferáz (Chst4) mRNS kifejeződése szignifikánsan fokozódott a MAdCAM-1 mutáns PP-ban, ami lehetővé teszi a MECA-79^{+} PNAd epitóp megjelenését. Ezek az eltérések különböznek az Nkx2-3 mutánsoknál megfigyelt mintázathoz hasonlítva, de a Chst4 mRNS fokozott átíródása mindkét mutánsban jelen volt (Kellermayer és mtsai, 2014), ami valószínűleg a PNAd molekulában a MECA-79 antitest által felismert glikoepitóp kialakításában játszott kulcsszerepére utal.

6.10.4. A nyálkahártya ILC3 megoszlás és az ér-addresszin regionális kifejeződésének korrelációja

Az ILC3 sejtek megoszlása és a MAdCAM-1 addresszin Nkx2-3 mutánsban, valamint a PNAd addresszin MAdCAM-1 mutánsban megfigyelt kifejeződése közötti összefüggés elemzéséhez kvantitatív immunfluoreszcens vizsgálatokat és Image J értékelést végeztünk.

Nkx2-3 hiányos egérben a vékonybél lamina propriában az első és második héten mérsékelt növekedést tapasztaltunk, míg a negyedik hétre statisztikailag szignifikáns csökkenést figyeltünk meg. Ezzel ellentétben a vastagbél MAdCAM-1 kifejeződése az Nkx2.3 mutánsokban minden vizsgálati időpontban a heterozigóta kontrollok intenzitása alatt volt, ami a különböző bélszakaszokban a MAdCAM-1 eltérő kinetikájú vesztésére utal.

A MAdCAM-1 mutáns egerek vékonybelében a második héten a vad típusú C57BL/6 kontrollhoz képest csak mérsékelt PNAd-expresszió növekedést észleltünk, ami a negyedik hétre szignifikánsan erősödött. A C57BL/6 egerek vékonybelében a PNAd kifejeződésének folya-



6.62. ábra: Az endoteliális addresszin posztnatális regionális kifejeződésének morfometriai elemzése
Az Nkx2-3 heterozigóta (fekete oszlop) és Nkx2-3 homozigóta mutáns (szürke oszlop) MAdCAM-1 kifejeződése (**A**) a jelölt időpontokban a vékonybélben (bal) és a vastagbélben (jobb) relatív pixel intenzitás (átlag szürke érték) alapján (n = 5, átlag ± SEM, két párhuzamos mérésben; *$p < 0,05$). A PNAd jelölés relatív pixel értékei kontroll C57Bl/6 (fekete oszlop) és MAdCAM-1$^{-/-}$ (szürke oszlop) egerekben (**B**) a vékonybélben (bal) és a vastagbélben (jobb) a jelölt időpontokban (n = 5, átlag ± SEM, két párhuzamos mérésben; *$p < 0,05$). *Vojkovics D, Kellermayer Z, Gábris F, Schippers A, Wagner N, Berta G, Farkas K, Balogh P. 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.*

matos fokozódása ellenére az ILC3 szám viszonylag stabil maradt, míg a MAdCAM-1 mutáns egérben a PNAd kifejeződés erősödése ellenére az ILC3 sejtszám szignifikánsan csökkent. Hasonló jellegű divergenciát figyeltünk meg a vastagbélben is a PNAd fokozódása és az ILC3 szám csökkenése között. Az összesített morfometriai eredményeket a **6.62. ábra** mutatja.

Ezen eredmények alapján nincs kimutatható kapcsolat a MAdCAM-1 addresszin fokozatos elvesztése (Nkx2-3 mutáció esetén) illetve a PNAd addresszin fokozatos megjelenése (MAdCAM-1 mutációban) és az ILC3 sejtek helyi megtelepedése között (Vojkovics és mtsai, 2019).

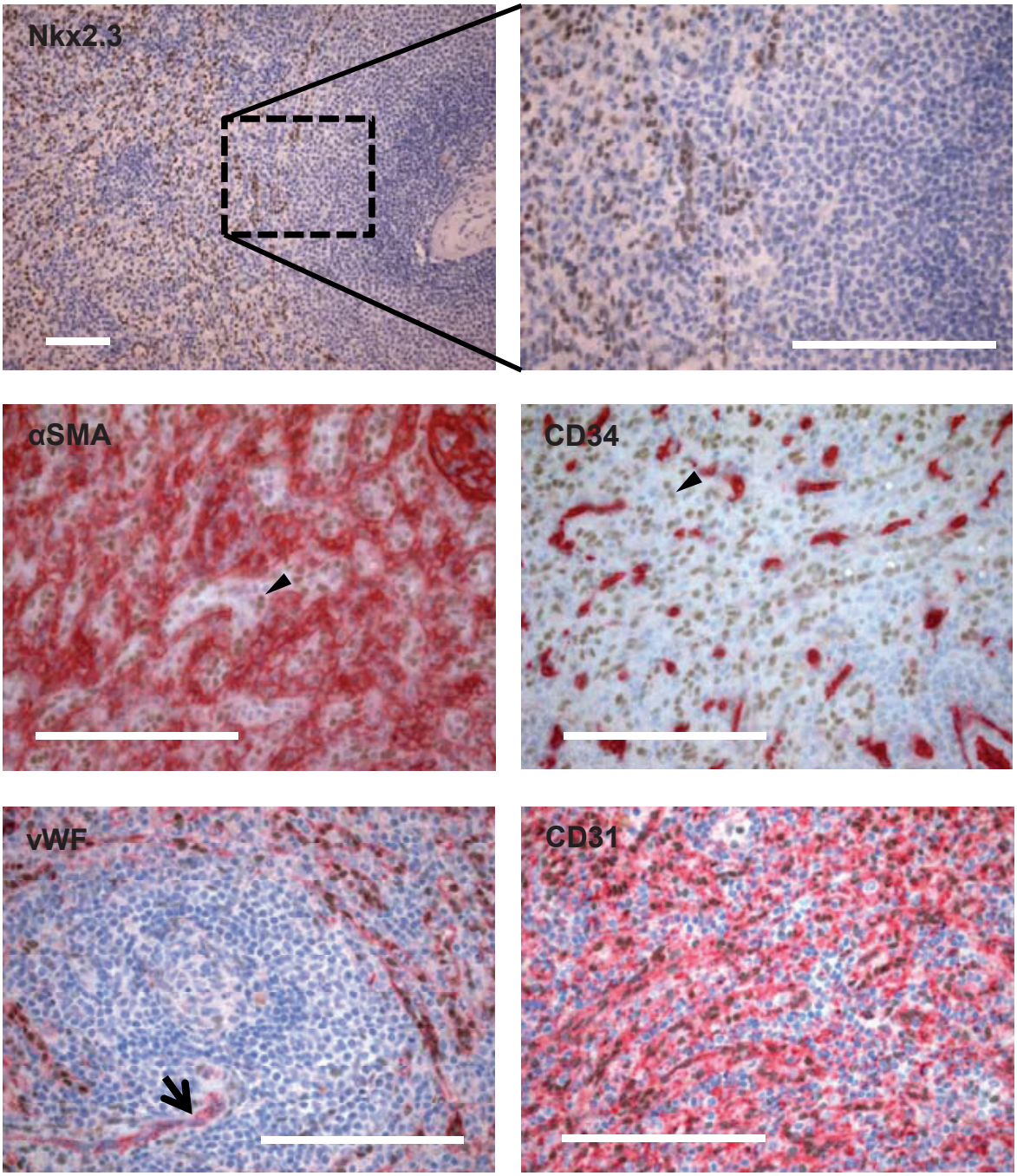
6.11. Nkx2-3$^+$ endoteliális és kötőszöveti komponensek azonosítása és jellemzése humán lépben és vastagbélben

Bár a különböző transzgenikus és célzott gén-kiütött egérmodellek számos fiziológiás és pathológiás sejt-differenciálódási és működési eseményre vonatkozóan szolgáltattak alapvető információkat, az egyes egér-modellek alkalmazhatóságánál fontos meghatározni azon lehetséges humán analóg szöveti összetevőket, amelyek megfeleltethetők az állatkísérletes rendszerekben vizsgált célsejteknek. Az egér lép vörös pulpában és a Peyer-plakkokban az Nkx2-3 gén hiányában megfigyelt érmintázat-fejlődési blokk miatt az analóg humán szövetalkotók meghatározására munkánk további részében fiatal felnőtt egyedekből származó lép és vastagbél-biopsziás szövetmintákon anti-humán Nkx2-3 monoklonális antitesttel és különböző kötőszöveti és vaszkuláris markereket felismerő referencia-antitestekkel többszörös immunhisztokémiai jelölést végeztünk. Fontos megjegyezni, hogy az egér és humán lép szerkezeti hasonlóságai mellett bizonyos részletei (így pl. az Nkx2-3 által is irányítottan szerveződő MZ) között jelentékeny eltérések vannak. A humán lép nem tartalmaz marginális szinuszt, és a CD34/CD141 markerek kifejeződése alapján számos különböző fenotípusú endotéllel bélelt érképlet található a vörös pulpában, így CD34$^+$/CD141$^-$ kapilláris endotél, CD34$^-$/CD141$^+$ vörös pulpa szinusz endotél, valamint a nagyobb arteriolák és venulák CD34$^+$/CD131$^+$ endotél sejtjei (Steiniger, 2015).

6.11.1. A humán lép Nkx2-3$^+$ ér-szegmentumainak szöveti és fenotípusbéli jellemzői

Az Nkx2-3 expressziót mutató sejtek azonosítására kettős immunhisztokémiai festést végeztünk, amelyben a 454C/H9 anti-humán Nkx2-3 patkány monoklonális antitest peroxidáz-reakcióval végzett kimutatása mellett az endotél sejtek jelölésére anti-CD31, anti-CD34 és anti-von Willebrand faktor (vWF) antitesteket, a makrofágok kimutatására anti-CD68, és a miofibroblasztok festésére anti- αSMA (α-sima izom aktin) antitesteket használtunk alkalikus foszfatáz eljárással.

Az Nkx2-3 transzkripciós faktort a vörös pulpa szinusz-bélelő endotél sejtjeiben nukleáris jelölődésként detektáltuk. Kettős jelöléssel az Nkx2-3$^+$ sejteket αSMA$^+$ periciták fogják közre, de a periciták és a CD68$^+$ makrofágok nem tartalmaztak immunhisztológiailag kimutatható nukleáris Nkx2-3 proteint. Érdekes módon az Nkx2-3$^+$ sejtek túlnyomó részben vWF$^+$ és CD34$^-$ fenotípust mutattak (**6.63. ábra**). Ezek alapján valószínűsítjük, hogy a humán lépben kimutatott Nkx2.3$^+$/CD31$^+$/CD34$^-$/vWF$^+$ endotéllel borított vörös pulpa szinusz megfeleltethető az egér lépben az IBL-9/2 antitesttel azonosított, és Nkx2-3 mutáns egérben defektív érszakasznak (Kellermayer és mtsai, 2016).

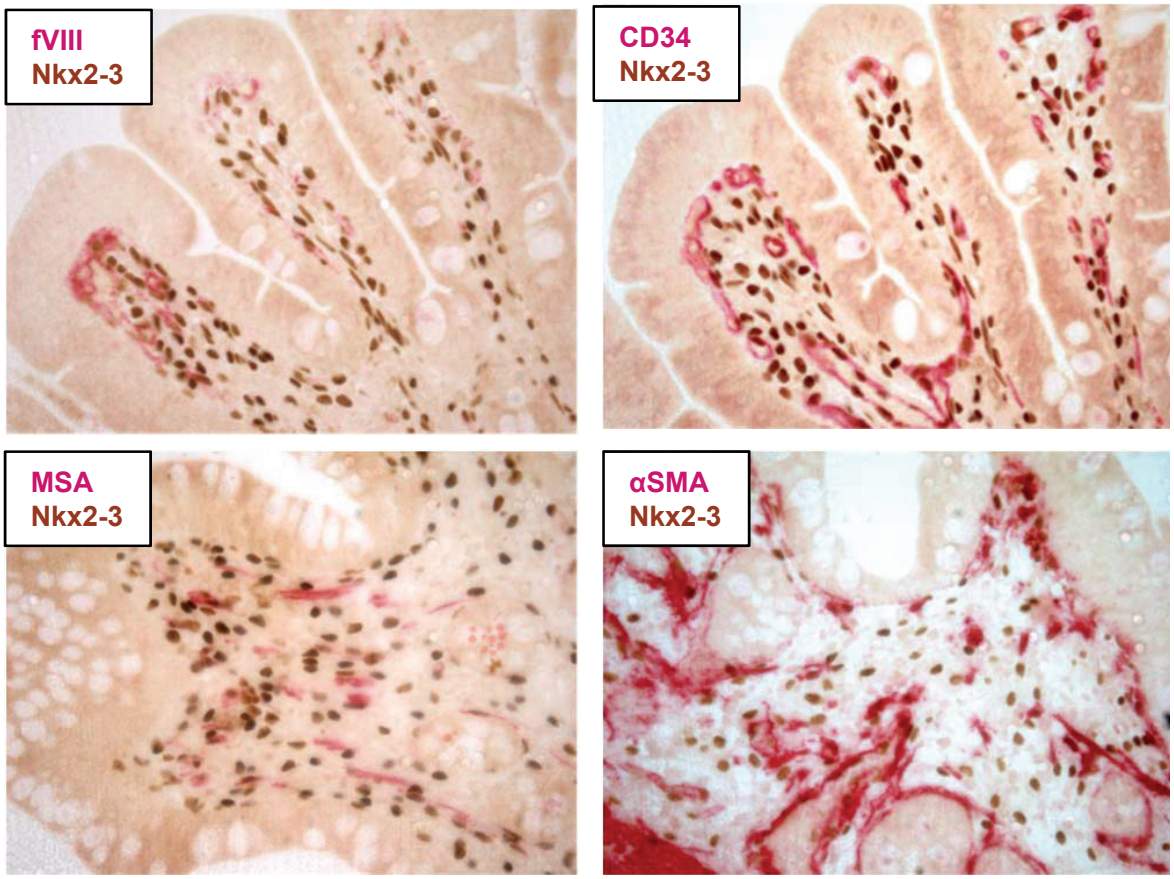


6.63. ábra: Az Nkx2-3 fehérje immunhisztokémiai kimutatása humán lépben a 454C/H9 monoklonális antitesttel

A barna DAB nukleáris reakciótermék a vörös pulpában (*fent/bal*) köteges elrendeződést mutat (*fent/jobb*). Ezeket a nukleáris Nkx2-3 pozitív sejteket (nyílhegy) vörös reakciótermékkel (Fast Red) detektált αSMA-pozitív periciták/retikuláris sejtek veszik körül (*középső/bal*), túlnyomó többségük CD34-negatív (*középső/bal*, nyílhegy). A vWF (*lent/bal*, nyíl) és CD31 (*lent/jobb*) endoteliális markerekkel nagymértékű kolokalizáció látható. Lépték= 100 μm. *Kellermayer Z, Hayasaka H, Kajtár B, Simon D, Robles EF, Martinez-Climent JA, Balogh P. Divergence of Vascular Specification in Visceral Lymphoid Organs-Genetic Determinants and Differentiation Checkpoints. Int Rev Immunol. 2016 35:489-502.*

6.11.2. A humán vastagbél Nkx2-3^{+} kötőszöveti összetevőinek szöveti és fenotípusbéli jellemzői

Az Nkx2-3 sejtvonal-specifikus kifejeződési mintázata a bélnyálkahártyában egyelőre sem egérben, sem emberben nem ismert. Humán vastagbél biopsziás mintákban endotél (VIII. faktor és CD34), illetve lamina propria mezenhímális sejt alcsoportok (MSA – izom-specifikus aktin és αSMA - α-sima izom aktin) markerekkel korreláltatva nem találtunk világos sejt-vonal kapcsolatot (**6.64. ábra**). A lép vörös pulpa szinusz endotél sejtvonal-specifikus jelölődésétől eltérően a bélben több különböző fenotípusú sejtben, de azoknak csak kisebb részében találtunk Nkx2-3 kifejeződést (Vojkovics és mtsai, 2018). Ezek a megfigyelések a korábbi szakaszban bemutatott, Nkx2-3^{LacZ} riporter egér bélminták X-gal festéssel kombinált VAP-1 (SSA/AOC3) immunhisztokémiai eredményeihez hasonlóan megerősítik, hogy az Nkx2-3 a mezenhímális komponensek között a perikriptális miofibroblasztokban (is) kifejeződik, ahol a vastagbél epitheliális őssejt-niche kialakításában és szabályozásában lehet szerepe (Hsia és mtsai, 2016; Kellermayer és mtsai, 2019).



6.64. ábra: Az Nkx2-3 fehérje immunhisztokémiai lokalizációja formol-fixált paraffinba ágyazott (FFPE) humán vastagbél biopsziás mintán

Az Nkx2-3 nukleáris reaktivitás (barna) az endotél sejtekkel (VIII. faktor, [fent/bal] és CD34 [*fent/jobb*]) vagy miofibroblaszt/simaizom sejtekkel (izom-specifikus aktin, MSA [*lent/bal*] és alfa-simaizom aktin, αSMA [*lent/jobb*]) szembeni referencia markerekkel (vörös) együtt végzett kettős jelölés a különböző sejttípusokban részleges koexpressziót mutat. Lépték= 100 µm. *Vojkovics D, Kellermayer Z, Kajtár B, Roncador G, Vincze Á, Balogh P. Nkx2-3-A Slippery Slope From Development Through Inflammation Toward Hematopoietic Malignancies. Biomark Insights. 2018 13:1177271918757480*

6.12. Az Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor onkogén szerepének vizsgálata B-sejtes malignus limfómákban

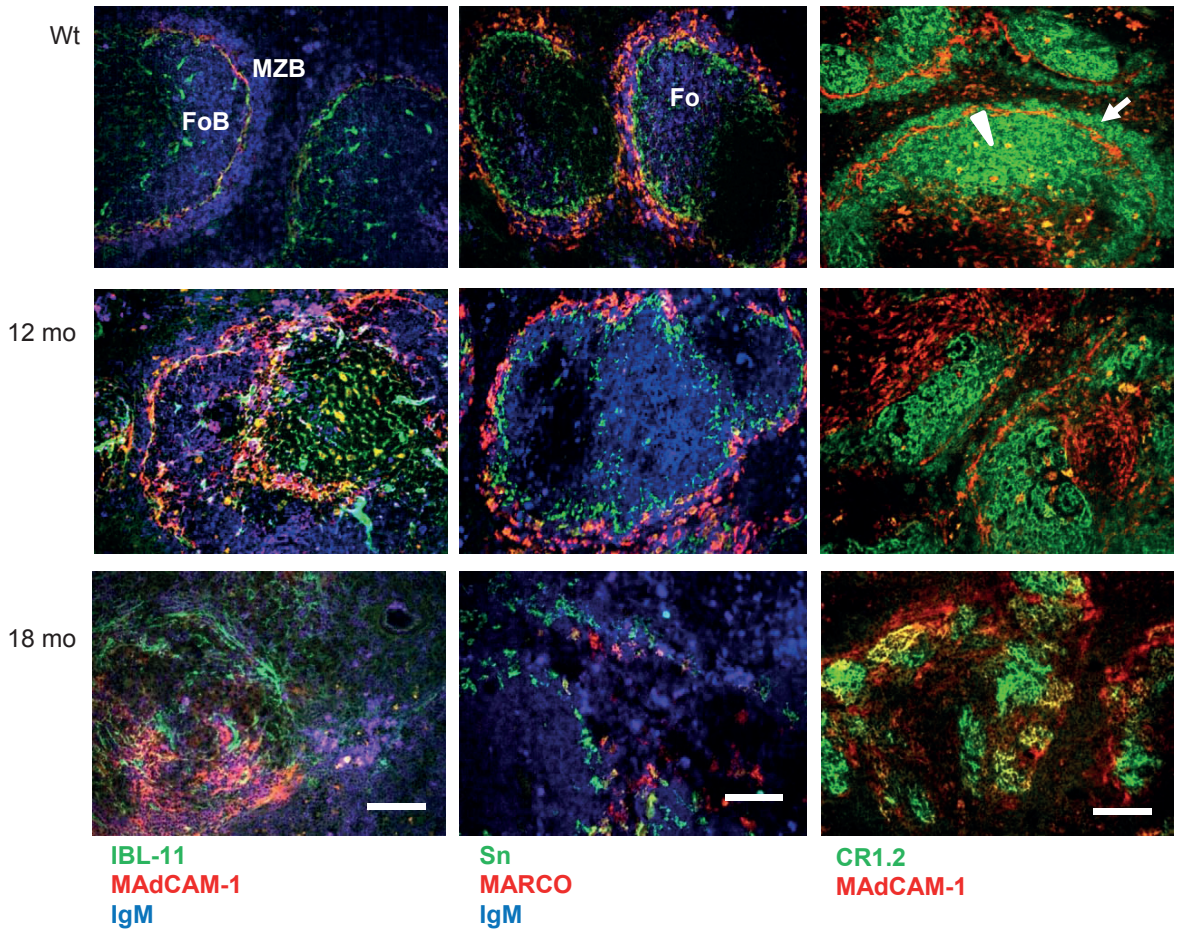
Munkacsoportunk és mások által tett megfigyelések szerint az Nkx2-3 transzkripciós faktor szerteágazó szerepet tölt be a lép és a bélnyálkahártya nyirokszöveti érelemeinek érésében és specializálódásában. Bár az egyes szervek Nkx2-3-függő szövetalkotóit eddig nem sikerült azonosítani, az eddigi eredmények meggyőzően igazolják, hogy a fehérje nem fejeződik ki hematopoetikus eredetű sejtekben. Ez megerősíti az Nkx2-3 hiányában fellépő szöveti változások stromális eredetét, ugyanakkor ezek az eltérések (közvetett módon) jelentős mértékben befolyásolhatják különböző normál B-sejt alcsoportok homeosztázisát is. Az Nkx2-3 hiányában fellépő lép szerkezeti zavarok valószínűleg felelősek a lép marginális zóna B-sejtek hiányáért (Pabst és mtsai, 2000). Ugyanakkor egyre több adat utal az Nkx2-3 és az Nkx család egyéb tagjainak közvetlen kórtani szerepére is, elsősorban vérképzőszervi daganatok kialakulásában (Homminga és mtsai, 2011; Homminga és mtsai, 2012; Vojkovics és mtsai, 2018).

A B-sejtes daganatok többségére jellemző c-*myc*, Bcl-2 és egyéb Bcl tagok és az Ig nehéz lánc közötti kromoszóma-transzlokáció mellett egyéb, ritkábban előforduló kromoszomális eltérések is felelőssé tehetők különböző típusú B-sejtes limfómák kialakulásáért. Ezek az eltérések egyrészt befolyásolhatják a BcR szignalizációt, másrészt megváltoztathatják a transzformált B-sejtek mikrokörnyezeti kapcsolódását (elhelyezkedését és motilitási mintázatát). Egy nemzetközi kutatás résztvevőiként egy Nkx2-3 – IgH transzlokáció (t[10;14][q24;q32]) következtében kialakuló marginális zóna B-sejtes limfóma állatkísérletes modelljében vizsgáltuk a limfóma kialakulása és progressziója során a nyirokszöveti átalakulást (Robles és mtsai, 2016).

6.12.1. Az Eμ-NKX2.3 Tg egerek B-sejtes limfoproliferációjának jellemzői

A korábban megismert transzlokációk mellett viszonylag nagyobb gyakoriságban fordult elő fokozott Nkx2-3 mRNS kifejeződés a lép marginális zóna B-sejt limfómában (SMZL) és nyálkahártya (MALT) limfómában. A B-sejtek bizonyos daganataiban leírt t(10;14)(q24;q32) transzlokációnak megfelelően a B-sejt specifikus EμSRα enhancer által irányított Eμ-*Nkx2-3* Tg C57BL/6 egér kialakításával az Nkx2-3 faktor B-sejtes tumorokban játszott szerepének vizsgálatára nyílik lehetőség.

Az Eμ-*Nkx2-3* Tg egerekben a B-sejt szám a kontrollhoz képest tízszeres növekedést mutatott, a marginális zóna (MZ) $B220^{+}CD21^{high}CD23^{low}$ B-sejt arány mérsékelt növekedésével és a $B220^{+}CD21^{int}CD23^{high}$ follikuláris B-sejt arány csökkenésével. A 12 hónapos lép szerkezeti vizsgálata IgM^{+}/MAdCAM-1^{+} B-sejteket mutatott ki, eleinte a T:B határterületben és a MZ:nyiroktüsző határfelületén. Ezek a Tg B-sejtek 18 hónapos korra nagymértékben infiltrálták a környezetüket, aminek során a MAdCAM-1^{+} maginális szinusz és a MZ marginális retikuláris sejt (MRC) alapváza destruálódott. Ehhez kapcsolódóan a MARCO-pozitív MZ makrofágok és a Sn/$CD169^{+}$ metallofil makrofágok is jórészt eltűntek. A MZ károsodása mellett a nyiroktüsző FDC hálózata is feltöredezett és összeesett (**6.65. ábra**). Ezzel egyidejűleg 12 hónapos korban LFA-1/ICAM-1 kifejező retikuláris sejtek és IgM-pozitív sejtek csoportosulását figyeltük meg,



6.65. ábra: Vad típusú és Eμ-*NKX2-3* Tg (12 és 18 hónapos) lépminták immunhisztológiai elemzése
A bal oldali oszlop a kontrollhoz képest a MAdCAM-1 pozitív IgM-pozitív sejtek és plazma sejtek fokozatos expanzióját mutatja, ami a 18 hónapos Tg egérben a nyiroktüsző szerkezetének felbomlásához vezet. A kontroll mintában a marginális retikuláris sejtek (IBL-11$^+$, zöld) és a MAdCAM-1$^+$ marginális szinusz (vörös) jól elhatárolja a nyiroktüsző (FoB) és marginális zóna (MzB) B-sejteket (IgM, kék).
A középső oszlop a marginális zóna makrofág rétegek fellazulását és fokozatos elvesztését mutatja. A kontroll mintához hasonlítva a marginális zóna belső rétegében elhelyezkedő szialoadhezin pozitív (Sn, zöld) makrofág-réteg feltöredezése, majd a külső rétegben elhelyezkedő MARCO pozitív (vörös) makrofágok nagyfokú csökkenése látható.
A jobb oldali oszlopban a follikuláris stromális alapszerkezet felbomlása látható. Kontroll egerekben a CR1.2 receptor (zöld) a MAdCAM-1 pozitív marginális szinusz belső oldalán az FDC hálózatot (nyílhegy), a külső oldalán több rétegben a marginális zóna B-sejteket azonosítja. A Tg egerekben az életkor előrehaladtával a MAdCAM-1 pozitív komponens kiszélesedése és a CR1.2 pozitív FDC kompaktálódása és széttöredezése jellemző (lépték= 200μm). *Robles EF, Mena-Varas M, Barrio L, Merino-Cortes SV, Balogh P, és mtsai. Homeobox NKX2-3 promotes marginal-zone lymphomagenesis by activating B-cell receptor signalling and shaping lymphocyte dynamics. Nat Commun. 2016 14 7:11889.*

ami a 18. hónapra a nyirokszövet teljes destruálódásához vezetett. Ezek alapján a 14-18 hónapos Tg egerekben a fokozatos lép-megnagyobbodás hátterében a MZ és follikuláris szerkezet felbomlása és a MZ B-sejtek kóros felszaporodása mutatható ki, ami nagy részben az Nkx2-3 hiányával ellentétes állapotnak felel meg (Pabst és mtsai, 2000; Tarlinton és mtsai, 2003).

Idős Eμ-*Nkx2-3* Tg egerekben a fokozatos leromlás a vad típusú egerekhez képest rövidebb túléléshez vezetett (átlagos túlélés 17,5-20,4 hónap a 25,6 hónappal szemben, $p<0,0001$).

Boncolás során mind a 38 megvizsgált Tg egérben megnagyobbodott lépet, 34-ben extranodális B-sejtes daganatot észleltünk a bélben (*n*=30), vesében (*n*=19), májban (*n*=22), nyálmirigyekben (*n*=7) és a tüdőkben (*n*=6). Az előrehaladott állapotú tumorokban nagy B-sejtes infiltrátumokat találtunk a sorvadt T-sejtes zóna és a nagymértékben csökkent vörös pulpa mellett. Immunfluoreszcens és immunhisztokémiai eljárással a limfómás B-sejtek magjában humán Nkx2-3 fehérje jelenlétét tudtuk kimutatni, igazolva azok Nkx2-3:IgH transzlokációhoz kapcsolható malignus transzformálódását. Néhány esetben a MALT-limfómákra jellemző extranodális invázió és ritkán DLBC-szerű transzformáció is megfigyelhető volt. Ezek alapján a kialakított modell alkalmas lehet a humán Nkx2-3-transzlokációhoz kapocsolódó B-sejtes limfoproliferatív kórképek vizsgálatára (Robles és mtsai, 2016).

6.13. Szerozális limfocita-dús aggregátumok, mint részlegesen struktúrált viszcerális nyirokszöveti összetevők szerepe B-sejtek és diffúz nagy B-sejtes limfóma hasűri nyirokszöveti terjedésében

A bél nyálkahártya-felületéhez kapcsolódó sokféle nyirokszövettel ellentétben a szerozális felület immunológiai védelmét ellátó nyirokszövetekről csak kevés ismeret áll rendelkezésre. A csepleszben elhelyezkedő tejfoltok (MS - milky spots) létezéséről már régóta van tudomásunk, viszont a kialakulásuk és speciális immunológiai jelentőségük nagyrészben ismeretlen.

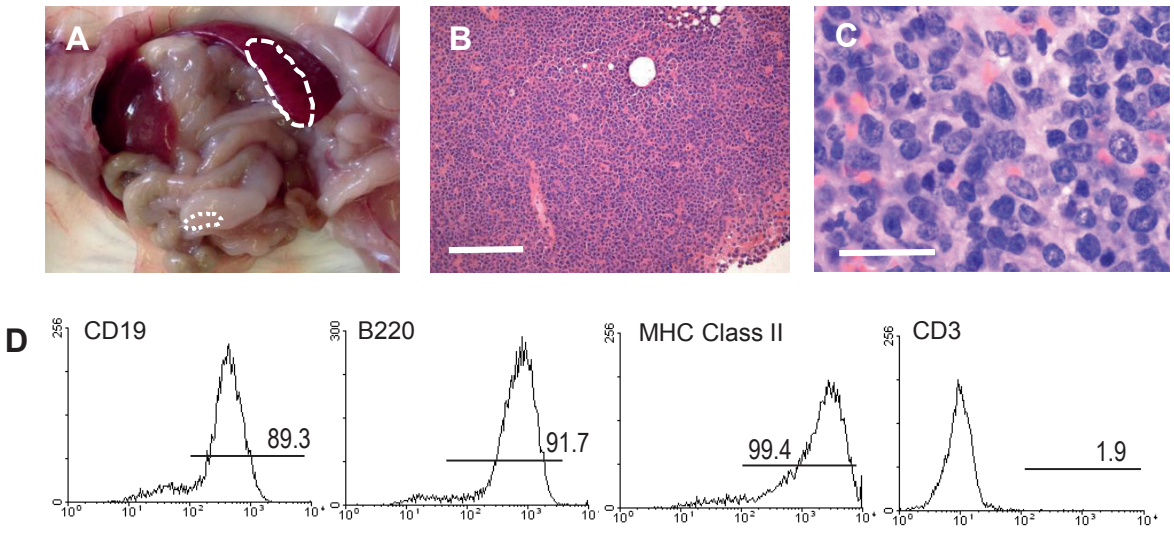
A közelmúltban a beleket ellátó ereket körülvevő hasüregi zsírszöveti kötegekben egy nagy számban előforduló új nyirokszöveti formációt azonosítottak, amelyet a zsír-asszociált limfoid csoportosulás (FALC – fat associated lymphoid clusters) elnevezéssel jelölnek (Moro és mtsai, 2010). A FALC szerepe a 2. típusú veleszületett limfoid sejtek (ILC2) számára megfelelő mikrokörnyezet kialakítása. Az ILC2 sejtek által termelt IL-5 a CXCL13 kemokin közreműködésével elősegíti a savós üregekben a B-1 B sejtek megtelepedését (Ansel és mtsai, 2002), valamint féregfertőzés során az IL-33 által stimulált ILC2 sejtek az IL-13 termelésük révén fokozzák a bél kehelysejtjeinek regenerációját. Ilyen módon a szerozális nyirokszöveti összetevők a mukózális szöveti integritás fenntartásában is fontos szerepet játszanak (Moro és mtsai, 2010).

A nyálkahártya nyirokszöveteinek és a perifériás nyirokcsomók képződése RORγt-függő ILC3/LTi sejtek jelenlétét igényli, viszont a MS és FALC (a LTα és CXCL13 dependenciájuk ellenére) függetlenek a LTi sejtektől. A LTα szerepe feltehetőleg annak alternatív TNF-receptor ligand aktivitásán alapul, ezáltal összekapcsolva a TNF-termelő makrofágokat és a TNF-receptort kifejező stromális sejteket vagy előalakjaikat (Bénézéch és mtsai, 2015). A *Rag2*$^{-/-}$*/Il2rg*$^{-/-}$ T/B/NK/ILC-deficiens mutánsokban megfigyelt hiányuk alapján valamilyen limfoid sejt szükséges a FALC struktúrák fejlődéséhez, bár az ILC2 szerepe a MS és FALC fejlődésében egyelőre vitatott (Cruz-Migoni és Camaano, 2016).

A közelmúltban izolált spontán nagy malignitású DLBCL-típusú egér B-sejt limfóma (Vojkovics és mtsai, 2016) hasüregi terjedésének vizsgálata révén lehetőség nyílt a szerozális nyirokszöveti képletek részletesebb megismerésére. Ennek a limfómának a legjellegzetesebb tulajdonsága a hasüregi zsírszövetben, a hasi nyirokcsomóban és lépben való felhalmozódása a hasüregi oltás után a hasi nyirokereken történő áttétképzés során. A következő szakaszban ezen szerozális nyirokszöveti összetevőknek a hasüregi limfociták megtapadásában betöltött szerepére vonatkozó eredményeinket foglalom össze (Jia és mtsai, 2020).

6.13.1. A Bc.DLFL1 limfóma immunfenotípusa és in vivo terjedési jellemzői

A Bc.DLFL1 limfómát eredetileg egy kezeletlen BALB/c egérben a bélfodorban elhelyezkedő hasüregi tumorként észleleltük, majd ismételt intraperitoneális oltással izoláltuk. A transzplantálható tumor kórszövettani vizsgálata limfoblasztos daganatot mutatott ki, pleiomorf citológiai jellemzővel, intenzív sejtosztódással és gyakori apoptotikus sejttel. A sejtek áramlási citometriai vizsgálata a CD45RA^{+}, B220^{+}, CD19^{+}, MHC-II^{+} fenotípus alapján a limfóma

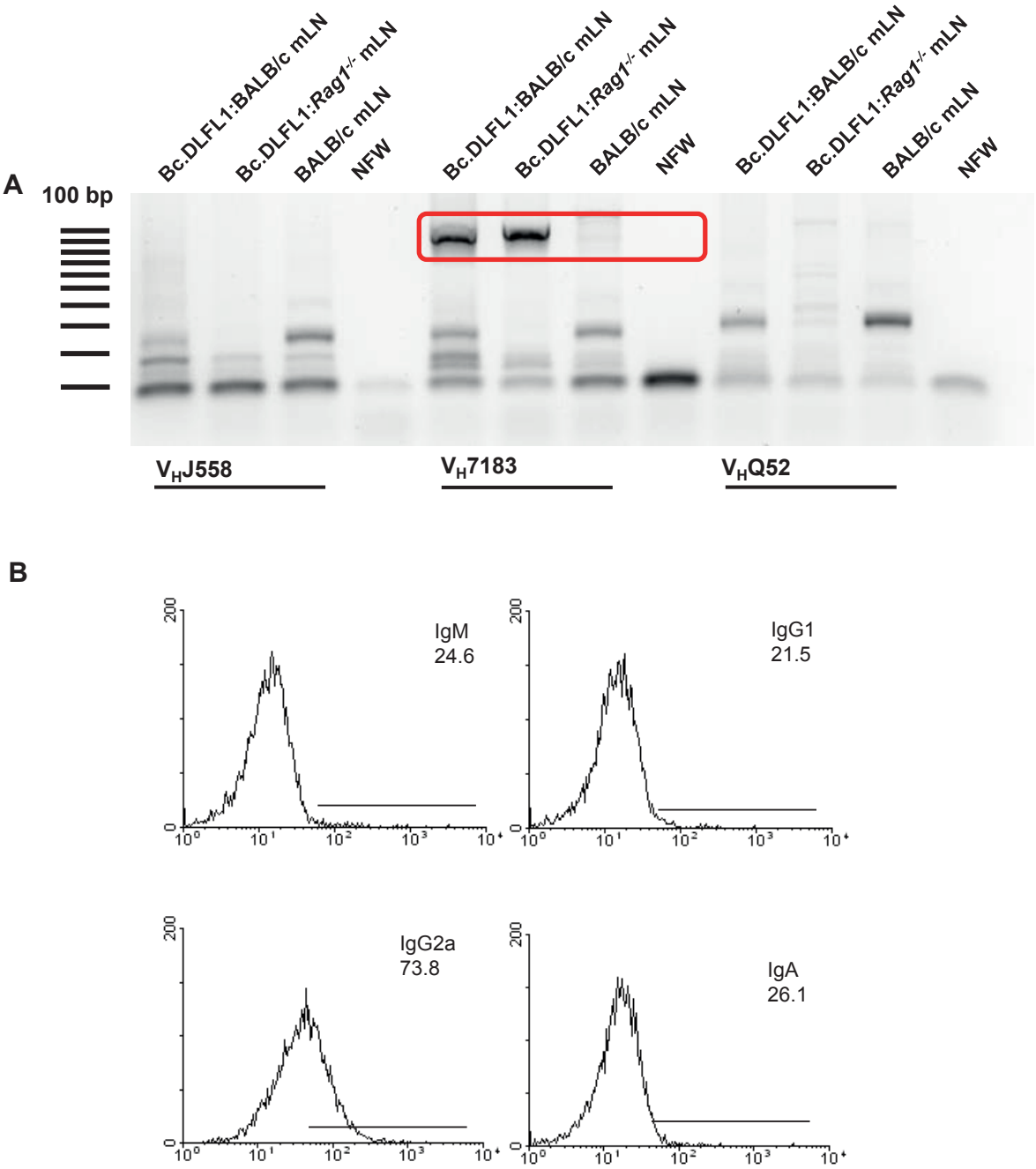


6.66. ábra: A Bc.DLFL1 limfóma makroszkópos megjelenése és hisztopatológiája
A normális mérethez viszonyítva nagymértékben megnövekedett lép (**A**) (szaggatott vonal) és hasi nyirokcsomó (pontozott vonal) jellemző a daganat előrehaladott stádiumában. Hasi nyirokcsomóból készült H&E festett metszeten (**B**) jól megfigyelhető a kiterjedt limfóma-infiltrátum. A tumor citológiai képe alapján (**C**) kevert szerkezetű, túlnyomórészt centrocita és centroblaszt citológiájú sejtek és apoptotikus törmelékek alkotják. Lépték= 20 μm. A Bc.DLFL1 sejtekkel oltott *Rag1*$^{-/-}$ recipiensek hasi nyirokcsomójának áramlási citometriás vizsgálata (**D**) a limfóma sejtek B-sejtes marker expresszióját (CD19, MHC-II és B220) és a CD3 hiányát mutatja. A reprezentatív képen a pozitív fluoreszcencia tartományt jelző vízszintes vonal feletti számok a pozitív sejtek százalékát mutatják (*n* = 7). *Vojkovics D, Kellermayer Z, Heidt D, Mihalj M, Kajtár B, Ernszt D, Kovács T, Németh P, Balogh P. 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 22:421-30.*

B-sejtes eredetét igazolta (**6.66. ábra**). Az Ig gén állapotára irányuló vizsgálataink során az IgV_H7183gén átrendeződését találtuk, a sejtfelszínen mérsékelt intenzitású IgG2a/κ immunglobulin expressziót detektáltunk (**6.67. ábra**). Ezen eredmények alapján a limfómát extrafollikuláris (feltételezhetően a marginális zónában elhelyezkedő memória B-sejtből kiinduló) DLBCL típusba soroltuk.

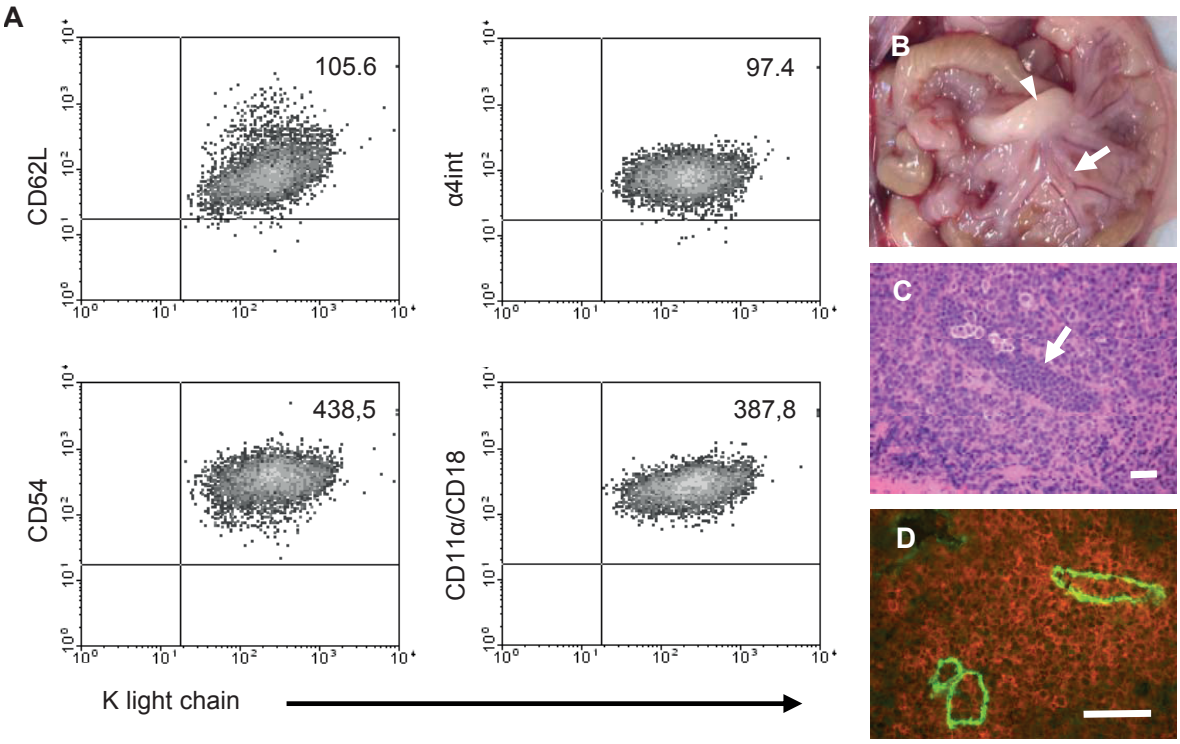
Intraperitoneális oltást követően a 4-7 nap körül a lépben elsősorban a PALS és a marginális zóna területében a CD11c$^+$ dendritikus sejtek közelében találtunk nagyobb mértékű limfóma-felhalmozódást. Ezzel egyidejűleg jelentékeny mértékű limfóma-felszaporodást tapasztaltunk a hasi nyirokcsomókban, valamint a bélfodor perivaszkuláris zsírszövetében és az itt elhelyezkedő nyirok-kapillárisokban, viszont a lépen és a mediasztinális nyirokcsomókon kívül más nyirokszövetekben (perifériás nyirokcsomók, Peyer-plakkok) csak a terminális állapotban lévő állatokban találtunk limfóma-áttétet. A szöveti megtapadásért felelős fontosabb adhéziós molekulák közül az ICAM-1 (CD54) és LFA-1 (CD11a/CD18) adhéziós molekulák kifejeződése nagyobb mértékű volt az L-szelektin (CD62L) és az α4 integrin (CD49d) markerekhez hasonlítva (**6.68. ábra**).

Ezen megfigyelések alapján feltételeztük, hogy a Bc.DLFL1 limfóma képes a bélfodorban futó nyirokerekbe belépni és ezeken keresztül eljutni a hasi nyirokcsomókba, de az onnan a vér- vagy nyirokkeringéssel történő (korai) továbbhaladása egyéb perifériás nyirokszövetek felé a lép és a mediasztinális nyirokcsomók kivételével gátolt (Vojkovics és mtsai, 2016).



6.67. ábra: A Bc.DLFL1 limfóma IgH V-gén átrendeződése és BcR izotípusa

A limfómával oltott BALB/c és *Rag1*$^{-/-}$ recipiensek infiltrált hasi nyirokcsomójának PCR-vizsgálata (**A**) a V_H7183 család hasonló IgH V-génátrendeződését mutatja (bekeretezett termék), a V_H1558 és VHQ52 családok esetében nincs specifikus termék a limfóma sejtek mintáiban. NFW, nukleáz-mentes víz. A BcDLFL.1 limfómával oltott egerek hasi nyirokcsomójának B220 és egér Ig-izotípus-specifikus áramlási citometriás vizsgálata (**B**) az IgG2a alacsony kifejeződését mutatja, a többi vizsgált Ig izotípus nem detektálható. Az egyes izotípusokhoz tartozó számok a pozitív frakció átlag fluoreszcencia intenzitását (MFI) mutatják. Reprezentatív kép, *n* = 5. *Vojkovics D, Kellermayer Z, Heidt D, Mihalj M, Kajtár B, Ernszt D, Kovács T, Németh P, Balogh P. 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 22:421-30.*

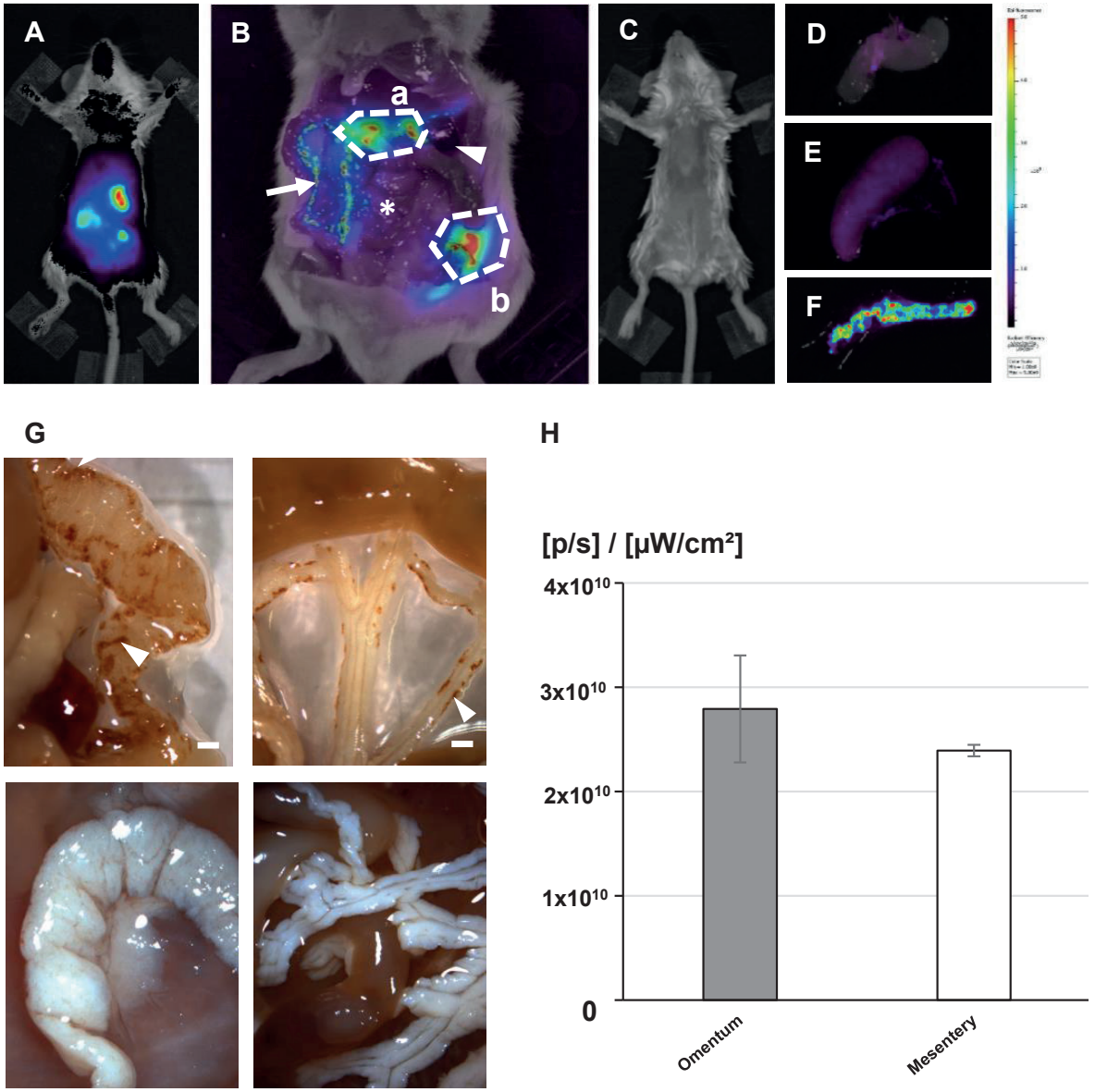


6.68. ábra: A Bc.DLFL1 limfóma adhéziós molekula-expressziója és limfogén terjedése

A *Rag1*$^{-/-}$ recipiensekből izolált limfóma sejtek adhéziós molekuláinak sejtfelszíni vizsgálata (**A**) kevesebb L-szelektin és α4 integrin és több CD54 (ICAM-1) és CD11α/CD18 (LFA-1) kifejeződést mutat, a limfóma sejteket κ könnyű lánc expressziójuk alapján azonosítottuk. BALB/c recipiensben makroszkóposan (**B**) a mezenteriális ereket körülvevő zsírszövetben (nyíl) és a hasi nyirokcsomóban (nyílhegy) egyaránt limfómás infiltráció látható. A mezenteriális nyirokkapillárist (nyílhegy) szorosan kitöltik a limfóma sejtek (H&E festés) (**C**). A mezenteriális zsírköteg immunfluoreszcens festése LYVE-1 (zöld) és B220 (vörös) markerekre (**D**) a limfóma sejtek tömeges jelenlétét mutatják a nyirokereken belül és kívül egyaránt. Reprezentatív kép, *n*= 5. *Vojkovics D, Kellermayer Z, Heidt D, Mihalj M, Kajtár B, Ernszt D, Kovács T, Németh P, Balogh P. 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 22:421-30.*

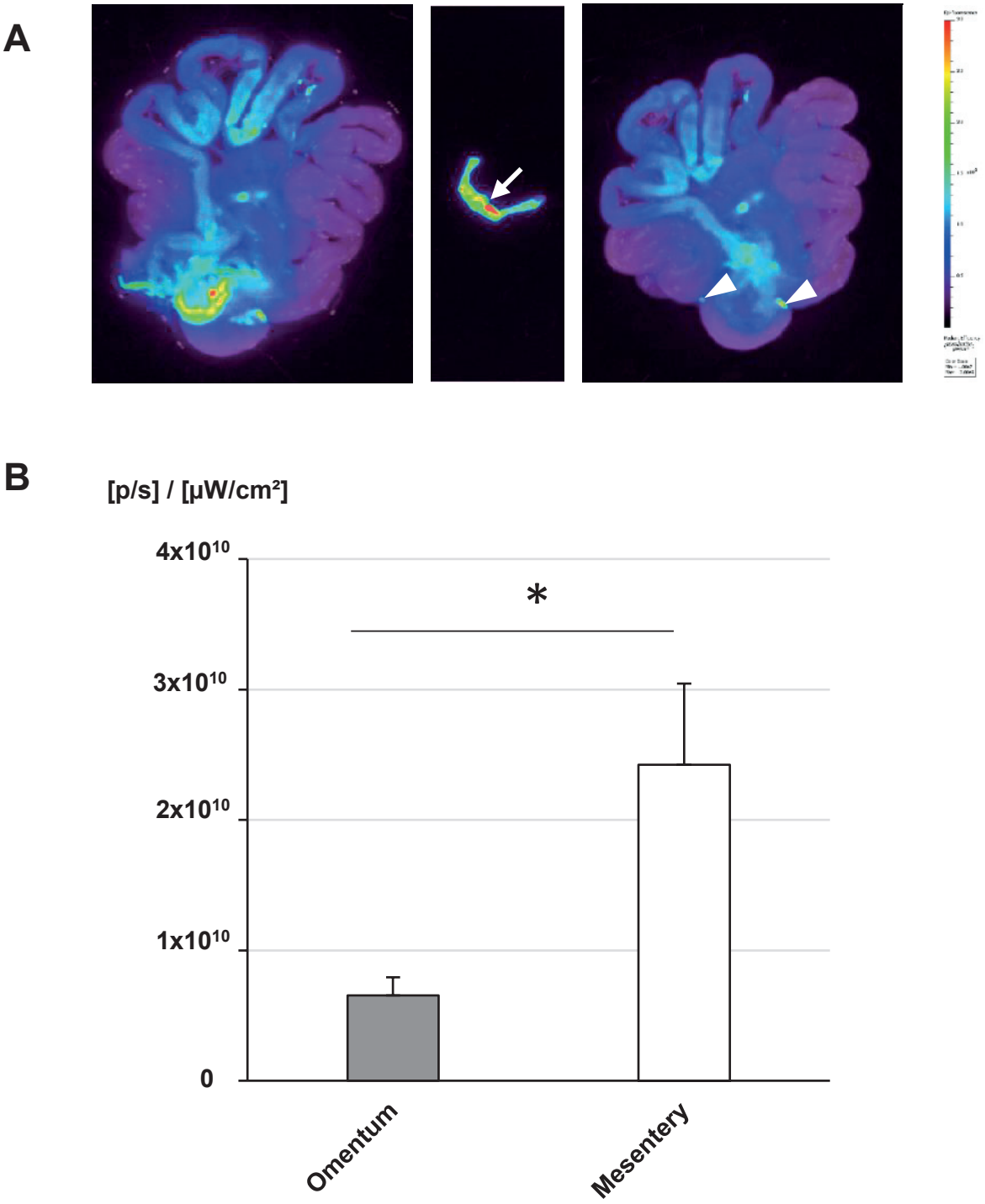
6.13.2. A Bc.DLFL1 limfóma korai szelektív megtapadása szerozális limfoid nyirokszövetekben

A Bc.DLFL1 sejtek korai megtapadásának helyét további sejt-követéses vizsgálattal határoztuk meg. Ennek során először XenoLight DiR lipofil festékkel jelölt limfóma sejteket oltottunk a hasüregbe, majd különböző időpontokban az eltávolított teljes bél-bélfodor-lép-cseplesz komplexet IVIS Lumina III imaging készülékkel vizsgáltuk. Ennek során erőteljes fluoreszcens jelet detektáltunk a csepleszben, valamint diszkrét gócokból álló gyöngyfüzér-szerű eloszlásban a vékonybél (elsősorban annak jejunális részletéhez kapcsolódó) mezenteriális perivaszkuláris zsírszöveti kötegei mentén. Az alkalmazott cianin-alapú festék lipofil jellege miatti lehetséges zsírszöveti jelölési műtermék kizárására elvégzett kísérletben a Bc.DLFL1 sejteket CFSE intracelluláris amino-reaktív festékkel jelöltük. BALB/c egerek hasüregébe történő oltás után különböző időpontokban vett mezentérium és cseplesz mintákat fixálást követően HRP-konjugált anti-FITC antitesttel jelöltük, majd rutin immunhisztokémiai eljárással

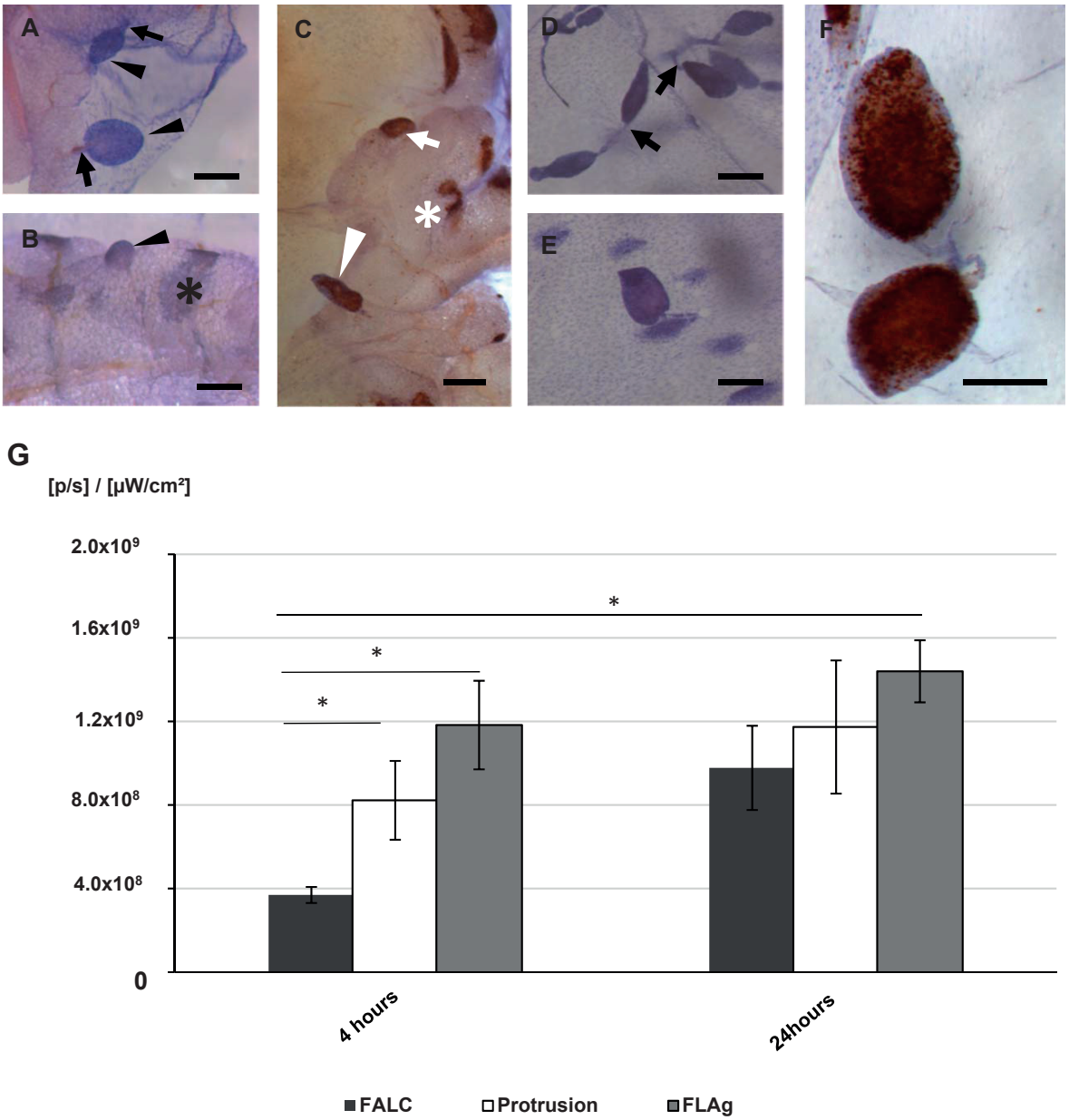


6.69. ábra: A Bc.DLFL1 limfóma korai megtapadásának fluoreszcens képalkotó és whole mount immunhisztokémiai lokalizálása a hasüregben

A XenoLight DiR jelölés után az intraperitoneálisan oltott Bc.DLFL1 limfóma sejtek a hasfalon keresztüli képalkotás (**A**) során három diffúz képletet alkotnak. A hasüreg felnyitása után (**B**) a csepleszben („a" jelölt terület) és a bélfodorban (nyíl) gyöngyfüzér-rajzolatban intenzíven jelölt gócok mutatkoznak, míg a lép (nyílhegy) és a hasi nyirokcsomók (*) nem tartalmaznak kimutatható limfóma-megtapadást. A „b" jelölt poligon az oltás helyét mutatja. Kezeletlen kontroll minta (**C**) a fluoreszcens bioimaging beállításhoz. Ex vivo eltávolított hasi nyirokcsomó (**D**) fluoreszcens szignál nélkül. Ex vivo eltávolított lép (**E**) szintén detektálható szignál nélkül. Intenzív jelölődés az ex vivo eltávolított csepleszben (**F**) (reprezentatív kép, *n*= 3). CFSE-jelölt Bc.DLFL1 sejtek kimutatása (**G**) a cseplesz és bélfodor whole-mount immunhisztokémiai festésével (PO-jelölt anti-FITC) 4 órával az oltás után, a nyílhegyek a specifikus reakció helyét mutatják (fent). Az alsó képpár kontroll egérből származó cseplesz (bal) és bélfodor (jobb) mintákat ábrázol. Lépték= 1 mm. A XenoLight DiR-jelölt Bc.DLFL1 limfóma sejtek csepleszhez (szürke oszlop) és bélfodorhoz (fehér oszlop) való kapcsolódásának (**H**) kvantitatív összehasonlítása (*n*=6 egér csoportonként, átlag ± SEM, *p<0,05). *Jia X, Gábris F, Jacobsen O, 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.*



6.70. ábra: MACS-tisztított és XenoLight DiR-jelölt B-sejtek csoportosulása a csepleszben és a bélfodorban
A hasüregi oltást követően a NIR fluoreszcens képalkotással (**A**) nyert képeken szelektív felhalmozódás látszik (*bal*), amiben a csepleszben konfluáló (*középen*, nyíl) és a bélfodorban (*jobb*, nyílhegyek) kisebb gócokban kimutatható a jelölt B-sejtek szerozális kapcsolódása. (Reprezentatív kép; *n*=5, kétszer ismételve.) A kötődés kvantitatív meghatározása (**B**) a csepleszben (szürke oszlop) és a bélfodorban (fehér oszlop) a teljes fotonkibocsájtás alapján (átlag ± SEM, *n*=5, $p<0,05$). *Jia X, Gábris F, Jacobsen O, 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.*



6.71. ábra: Szerozális limfoid organoidok megjelenési formái

A hasfodorhoz kapcsolódó FLAg (nyílhegyek) kapillárisokat tartalmazó vékony nyelekkel (nyíl) kapcsolódik (**A**) a zsírszövethez. A zsírszövetben széles alappal rendelkező, a zsírszövet felületéről kiemelkedő protrúziót (nyílhegy) és lapos, leukocitákkal kevésbé kitöltött FALC (*) képleteket (**B**) is tartalmaz. Az intraperitoneálisan oltott Bc.DLFL1 sejtek (**C**) egyaránt kapcsolódnak FLAg (nyílhegy), protrúzió (nyíl) és FALC (*) képletekhez (HRP anti-FITC whole-mount immunhisztokémia DAB-H_2O_2 reakcióval). A hashártyához vékony nyelekkel (nyíl) kapcsolódó FLAg képletek tipikusan páros elrendeződésben (**D**) mutathatók ki. Szoliter FLAg (**E**) a hashártyán. A hashártyán elhelyezkedő FLAg képletek hatékonyan kötik a hasüregbe oltott CFSE-jelölt Bc.DLFL1 sejteket négy órával az oltás után elvégzett HRP anti-FITC whole-mount immunhisztokémiai (**F**) mintán. Lépték=200 µm. A Bc.DLFL1 limfóma sejtek különböző limfoid organoidokhoz kapcsolódásának (**G**) kvantitatív értékelése XenoLight DiR teljes fotonkibocsájtás alapján a jelölt variánsokban (átlag ± SEM, n=5, p<0,05). *Jia X, Gábris F, Jacobsen O, 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.*

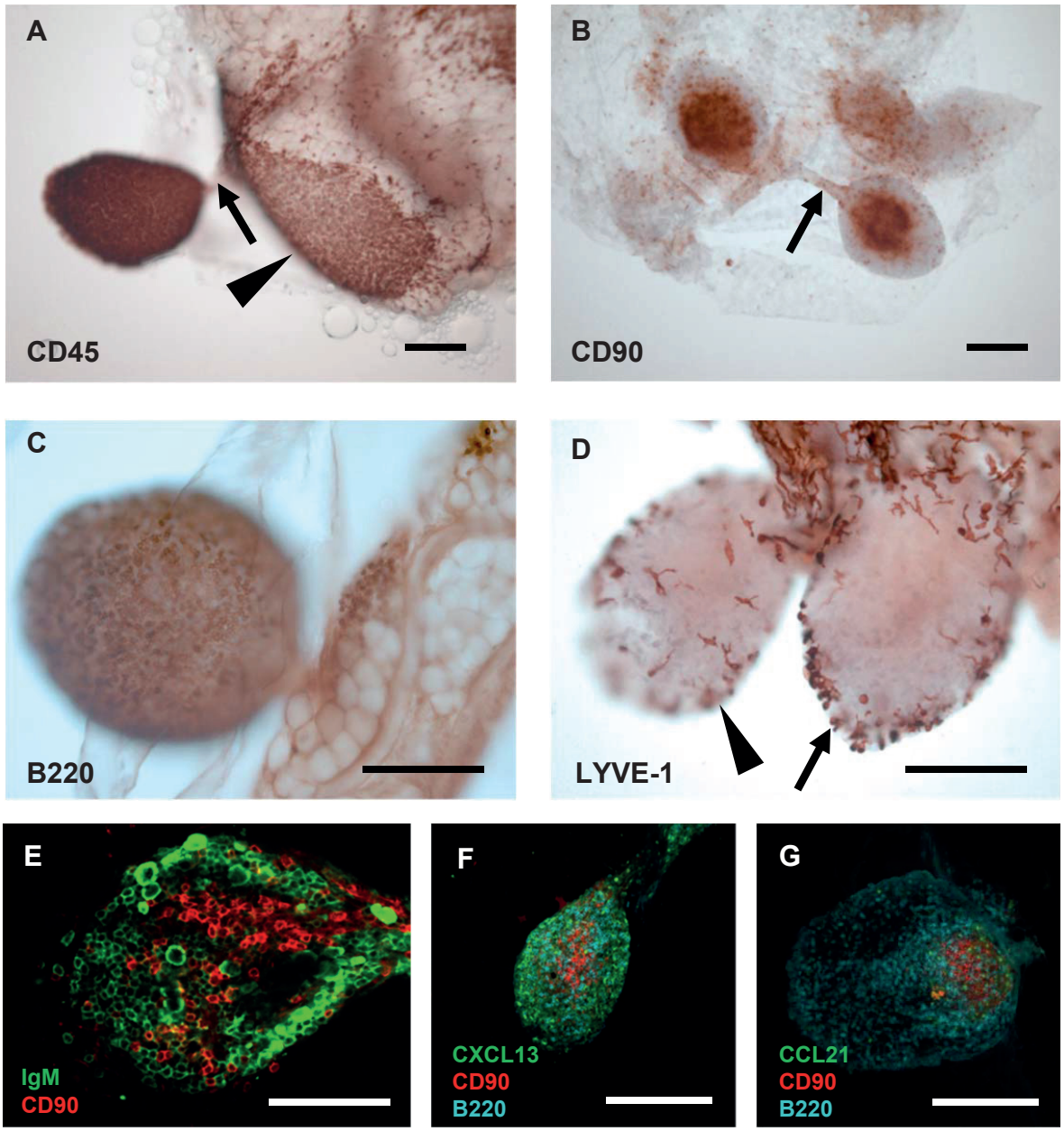
DAB-H_2O_2 előhívással vizualizáltuk. A DAB-termék festődési mintázata megfelelt a XenoLight DiR jel megoszlásának (**6.69. ábra**). MACS-tisztított lép normál B-sejtek oltásával szintén kiterjedt fokális omentális és mezenteriális sejt-megtapadást mutattunk ki XenoLight DiR detektálással (**6.70. ábra**).

A bélfodor mentén elhelyezkedő limfóma-kötő részek azonosítására a CFSE-jelölt Bc.DLFL1 sejtek beoltása után az eltávolított bél-bélfodor-lép-csepleszkomplexet fixálást követően hematoxilinban festettük, majd a limfóma sejteket HRP-jelölt anti-FITC antitesttel detektáltuk. Ennek során a csepleszben és a bélfodorban, valamint a lép mentén elhelyezkedő bursa omentálisban a limfóma sejtek kapcsolódásainál jellegzetes leukocita-dús szövet-formációkat figyeltünk meg. Ezek között kisebb-nagyobb laza szerkezetű, felületes elhelyezkedésű képleteket, valamint élesen demarkálódó, ahol vagy széles alapról részlegesen kiemelkedő, vagy hosszabb-rövidebb nyéllel a hashártyához vagy a bélfodor zsírszövetéhez kapcsolódó formációkat találtunk. Ezen utóbbiakat a jellegzetes megjelenésük miatt leveles limfoid aggregátumnak neveztük el (Foliate Lymphoid Aggregates – FLAg). Mikrodisszekcióval eltávolított organoidok összehasonlítása kimutatta, hogy a FLAg képletek rendelkeznek a legnagyobb mértékű limfóma-kötő kapacitással (**6.71. ábra**).

6.13.3. FLAg: részlegesen kompartmentalizált új nyirokszöveti variáns

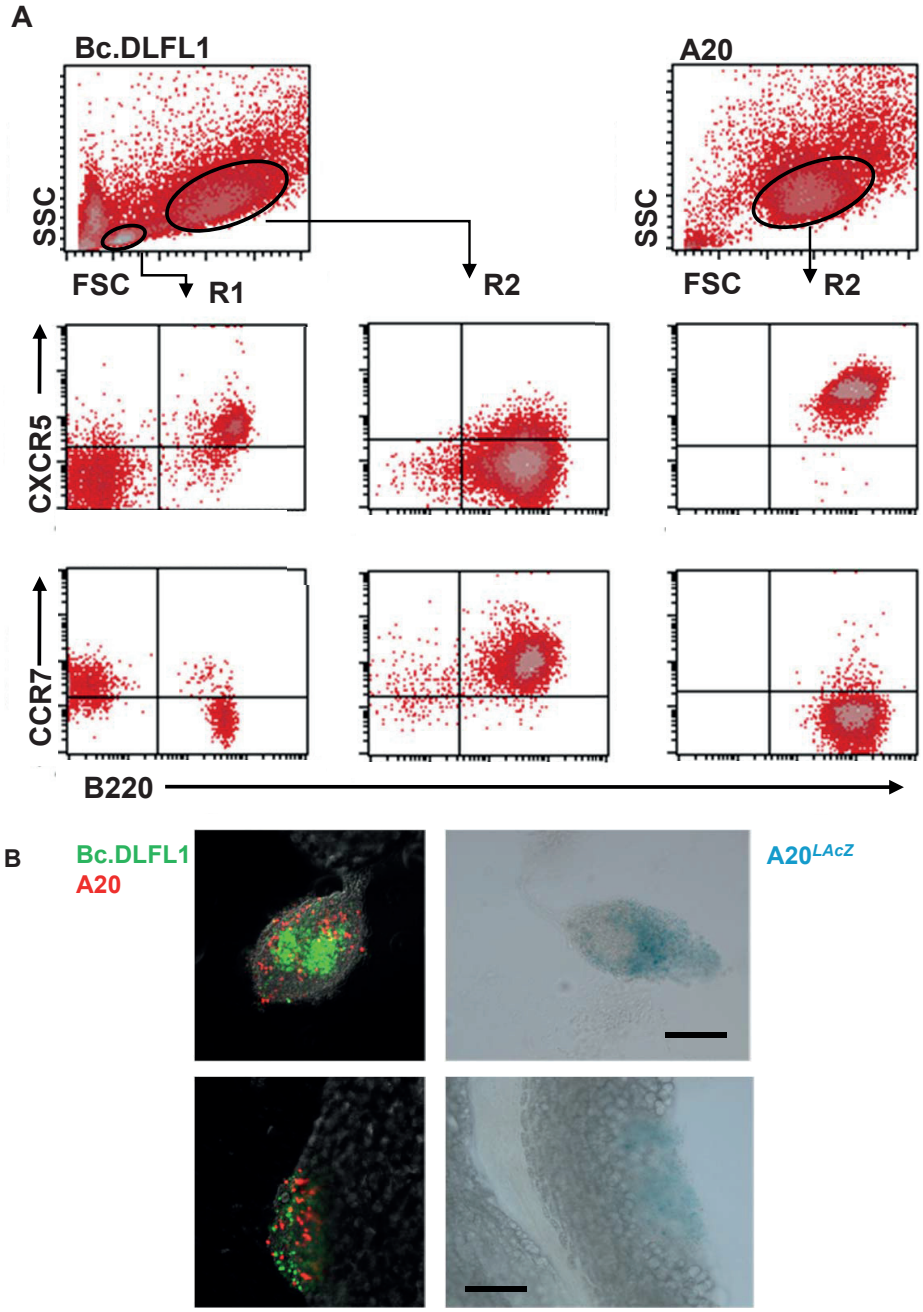
A FLAg képletek zsírszöveti kapcsolódása és kis mérete nem teszi lehetővé fagyasztott minta feldolgozását, ezért ehhez az egész mezentériumot teljességében, vagy legalábbis jelentékeny részben „whole mount" eljárással vizsgáltuk többszörös jelöléses immunfluoreszcens illetve HRP-alapú immunhisztokémiai módszerekkel. A lipid-dús szövet megfelelő érzékenységű jelöléséhez számos technikai részletet kellett optimalizálnunk (fixálás, antitest-penetrálás elősegítése, mosás, telítés, háttér-gátlás, puffer-összetétel).

A CD45 marker alapján a FLAg leukocitákkal kompaktan kitöltöttnek bizonyult, a lazább szerkezetű MS vagy FALC képletekhez viszonyítva nagyobb denzitású jelölődést figyeltünk meg. A FLAg levél-részének belső területében anti-CD90 (Thy-1) és anti-CD3 jelölődést mutató T-sejtes zónát találtunk, míg a levél-rész perifériás sávjában, a csúcson, valamint a nyél kapcsolódási pontjainál anti-B220 és anti-IgM jelölődéssel kimutatható B-sejtes zónát figyeltünk meg. Az egyes limfocita-alcsoportok perifériás nyirokszöveti megoszlását irányító kemokinek közül a CXCL13 a levél-részek perifériás szegmensében mutatható ki, a T-sejtekre ható CCL21 a levél-részen belül annak centrális régiójában csak igen kis mennyiségben termelődött (**6.72. ábra**). Ennek megfelelően a hasüregi oltásukat követően az extrafollikuláris eredetű Bc.DLFL1 sejtek a csökkent CXCR5 és fokozott CCR7 kemokin-receptor kifejeződésüknek megfelelően a FLAg centrális részében, míg az ellentétes kemokin-receptor mintázatot mutató follikuláris DLBCL eredetű A20 limfóma sejtek a FLAg levél-összetevőjének perifériás részében halmozódtak fel. A diffúzabb szerkezetű „milky spot" területeken nem volt hasonló elkülönülés (**6.73. ábra**).



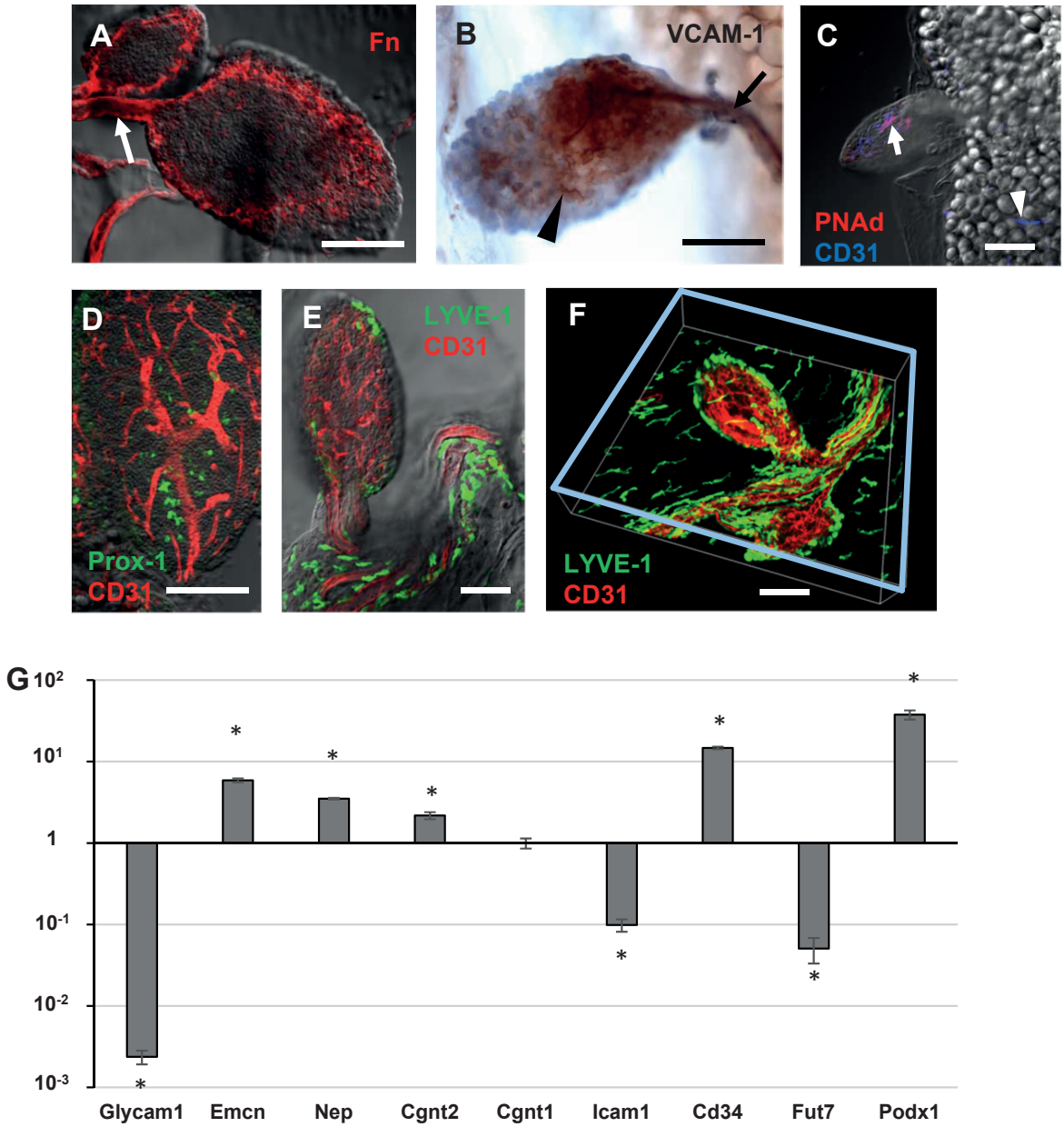
6.72. ábra: A FLAg variáns nyirokszöveti szerkezete és kemokin-kompartmentjei

A whole-mount immunhisztokémiai mintákban (**A**) a zsírszövethez vékony nyéllel kapcsolódó FLAg (nyíl) és a lazább szerkezetű lapos FALC (nyílhegy) anti-CD45 festéssel eltérő leukocita-sűrűséget mutat. A hashártyához rögzülő FLAg levél-részének centrális részében CD90/Thy-1.2-pozitív T-sejtek (**B**) találhatók, az összekötő nyél (nyíl) jól kivehető, a B220-pozitív B-sejtek elrendeződése kevésbé (**C**) megállapítható. A bélfodorban egymás mellett elhelyezkedő FLAg (nyílhegy) és protrúzió (nyíl) képletek (**D**) széli része LYVE-1-pozitív makrofágokat tartalmaz. A csepleszhez kapcsolódó FLAg konfokális mikroszkópos képén (**E**) az IgM^+ B-sejtek (zöld) a levél-rész perifériás részén helyezkednek el, míg a CD90-pozitív T-sejtek a centrális szakaszban helyezkednek el. A FLAg-on belül a B-sejt kemokin CXCL13 (zöld) a levél-rész perifériás részében a B-sejt (kék) lokalizációnak megfelelően található (**F**), a centrális T-sejt régióban (vörös) kevésbé kifejezett. A T-sejtekre ható CCL21 (zöld) a centrális elhelyezkedésű T-sejtekkel (vörös) mutat átfedést (**G**), a B-sejtekben dúsabb (kék) perifériás FLAg részben nem detektálható. Lépték=200µm, reprezentatív ábrák, *n*=5, kétszer ismételve. *Jia X, Gábris F, Jacobsen O, 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.*



6.73. ábra: A Bc.DLFL1 és A20 DLBC limfóma sejtek eltérő CXCR5 és CCR7 kemokin receptor kifejeződése és elhelyezkedése FLAg képleteken belül

A Bc.DLFL1 limfóma-hordozó egér nyirokcsomójának nagyság/komplexitás (FSC/SSC) sűrűség-ábráján jól elkülöníthető a reziduális limfociták (R1) és limfoblasztok (R2) csoportja. A szövettenyészetből származó A20 sejtek az utóbbinak megfelelő fényszórási- fizikai tulajdonságokat hordozzák. Az R1 kapuban elhelyezkedő normál limfocitákon belül a $B220^+$ B-sejtek CXCR5 receptort expresszálnak, a $B220^-$ non-B-sejteken túlnyomórészt CCR7 kemokin-receptor detektálható (**A**). Az R2 kapuban a Bc.DLFL1 sejtek $B220^+/CXCR5^-/CCR7^+$ fenotípust mutatnak, míg az A20 sejteken a normál B-sejtekre jellemző $B220^+/CXCR5^+/CCR7^-$ fenotípust látjuk. A FLAg képleten (fent) belül a T-sejt típusú CCR7 kemokin-receptornak megfelelően a Bc. DLFL1 sejtek (zöld) a centrális részben, míg a $CXCR5^+$ A20 sejtek (vörös) a perifériás részben dúsulnak (**B**) két órával a sejt-keverék oltása után. Hasonló elkülönülés a diffúzabb szerkezetű FALC-ban nem figyelhető meg (*lent*). A fluoreszcens jelöléshez hasonlóan LacZ-expresszáló A20 sejtek önmagukban szintén a FLAg perifériás részében halmozódnak, a FALC esetében laza diffúz elrendeződés látható X-gal festéssel. Lépték=100μm, reprezentatív ábrák, *n*=6, kétszer ismételve. *Jia X, Gábris F, Jacobsen O, 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.*



6.74. ábra: A FLAg stromális szerveződése és vaszkuláris jellemzői

A membránhoz kapcsolódó FLAg fibronektin (Fn, vörös) immunfluoreszcens jelölése (**A**) gazdag hálózatot mutat, ami a nyél-részletre (nyíl) is kiterjed. A FLAg centrális részében nyúlványos megjelenésű VCAM-1 pozitív sejtek láthatók (**B**) whole-mount immunhisztokémiai jelöléssel (nyílhegy), a nyél tengelyében VCAM-1-pozitív kapilláris látható (nyíl). A FLAg testben konfokális mikroszópos képen (**C**) a CD31-pozitív (kék) érhálózaton belül rövid PNAd-pozitív (vörös) jelölődés is látható, az átfedés miatt lila tónusban (nyíl), a zsírszövetben csak CD31-pozitivitás mutatkozik (nyílhegy). A CD31-pozitív (vörös) érhálózatban csak elszórt Prox-1 nyirokendotél-specifikus transzkripciós faktor (**D**) expresszió (zöld) látható, a sejtek nem rendeződnek folyamatos nyirokerekké. A LYVE-1 kifejeződés (zöld) a peritoneális makrofágokra és a FLAg széli részén elhelyezkedő makrofágokra jellemző (**E**), a FLAg-on belül a CD31-pozitív (vörös) endotél sejtek LYVE-1- fenotípusúak. A 3D rekonstrukcióval (**F**) jól látható a FLAg CD31-pozitív érhálózat (vörös) és a LYVE-1-pozitív makrofág-csoportosulások (zöld) elkülönülése. Lépték: 50µm, reprezentatív ábrák, n=6, kétszer ismételve. Az oszlopdiagramok a megjelölt PNAd vázfehérje célgén (GlyCAM, endomucin, nepmucin [Cd300lg], CD34, ICAM-1 podocalyxin-like protein) és glikozilációs enzimek (Cgnt1, Cgnt2, Fut7) mRNS real-time qPCR eljárással β-aktinhoz viszonyított kifejeződését ábrázolják (**G**) perifériás nyirokcsomók hasonló adatához hasonlítva (vízszintes vonallal jelezve, $n = 6$; átlag ± SEM, két párhuzamos mérésben; $*p < 0{,}05$). *Jia X, Gábris F, Jacobsen O, 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.*

A FLAg stromális alapstruktúra tanulmányozására végzett fibronektin-jelöléssel gazdag ECM-hálózatot találtunk, ami stabil kötőszöveti szerveződésre utal. Immunhisztokémiai vizsgálataink során az IBL-20 antitesttel erőteljes vaszkuláris endotél-reaktivitást észleltünk, míg anti-LYVE-1 antitesttel (a mezenteriális nyirokerek mellett) a FLAg képletek széli részében lévő makrofágok is intenzív jelölődést mutattak. A perifériás nyirokszöveti stromális komponensekre jellemző VCAM-1 marker vizsgálatakor vaszkuláris és retikuláris mintázatot mutató összetevőket találtunk. A MAdCAM-1 immunhisztológiai jelölése nem mutatott szelektív addresszin kifejeződést, míg a nyirokcsomó HEV-re jellemző PNAd a CD31-pozitív érelemek viszonylag rövid szegmentumaiban kimutatható volt.

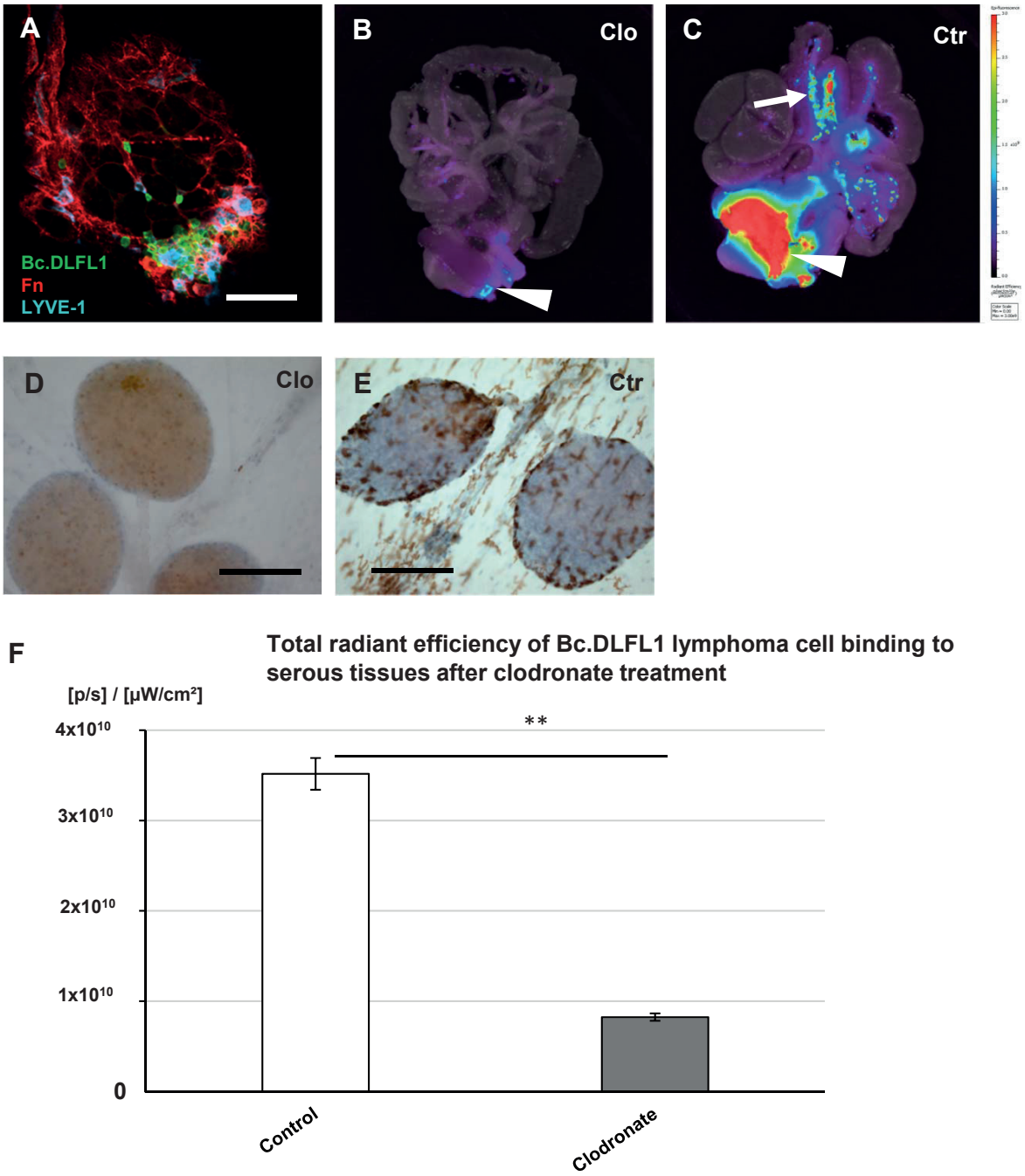
A PNAd megjelenését a MECA-79 antitesttel való jelölődésen kívül a PNAd vázfehérjék és glikozilációs enzimek mRNS kifejeződését kvantitatív real-time PCR eljárással is megerősítettük. Ugyanakkor a FLAg képletekben nem találtunk nyirokendotél-sejteket sem a nyirokkapillárisokra jellemző LYVE-1 festéssel, sem a Prox-1 promóter-irányította GFP jelenlét alapján (**6.74. ábra**).

6.13.4. A FLAg egyes komponenseinek szerepe a limfoid sejtek felületi és vaszkuláris megtapadásában

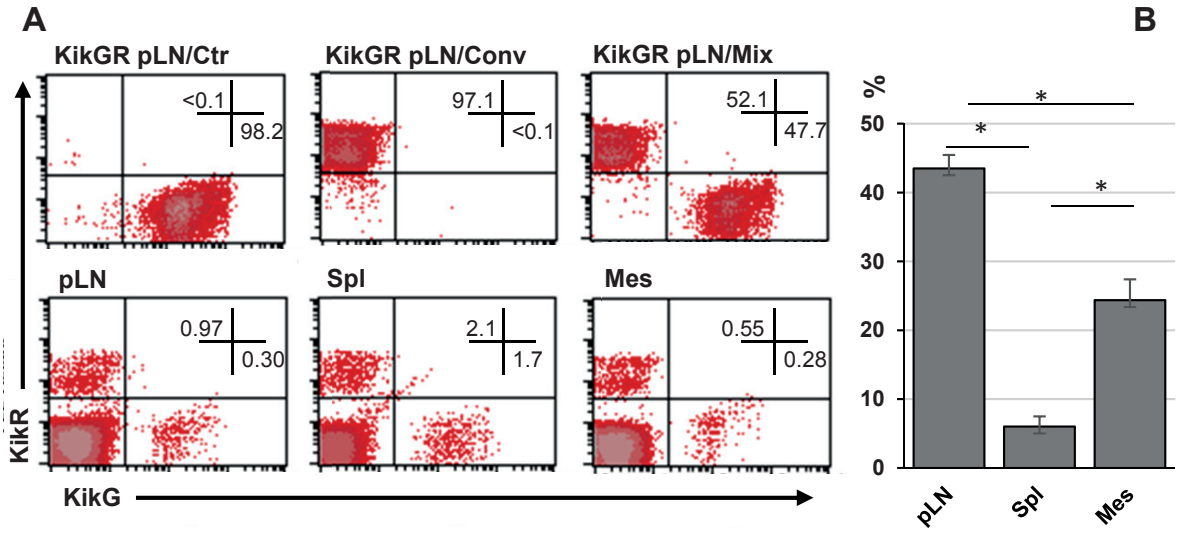
A LYVE-1-pozitív és makrofág megjelenésű sejtek elhelyezkedése a FLAg levél-részletének széli részében felvetette ezen sejtek szerepét a Bc.DLFL1 limfóma sejtek peritoneális megtapadásában. Ennek vizsgálatára az egereket fagocita-depletáló klodronát-tartalmú liposzómával oltottuk, majd egy nappal később XenoLight DiR-jelölt limfóma sejtekkel injektáltuk. A megtapadás mértékét a sejtek fluoreszcens detektálásával és teljes emittált foton meghatározással vizsgáltuk. A PBS-tartalmú kontroll liposzóma-kezeléshez képest a klodronát-liposzóma a LYVE-1$^+$ sejtek drasztikus depletálásával egyidejűleg a peritoneális felületi limfóma sejt-megtapadás 80%-os csökkenését váltotta ki (**6.75. ábra**).

A FLAg képletek MECA-79-pozitív érszakaszainak a szerozális nyirokszövetek hematogén limfocita-megtapadásban betöltött szerepét a PNAd:CD62L kötődést gátló MEL-14 anti-CD62L antitesttel elvégzett, Kikume fotokonverziós eljárással kombinált *in vivo* kompeticiós homing kísérletben vizsgáltuk. Ennek során a konvertált (vörös/KikR) sejtekhez képest a MEL-14 antitesttel előinkubált konvertálatlan (zöld/KikG) limfocitáknak az érpályán keresztül a szerozális nyirokszövetekbe irányuló megtelepedésének részleges (perifériás nyirokcsomókhoz képest 50%-os) gátlását tudtuk kiváltani (**6.76. ábra**).

Ezek alapján a korábban leírt diffúz elrendeződésű MS és FALC formációkkal ellentétben a FLAg képletekre a perifériás nyirokszövetekhez hasonló, de kevésbé komplett stromális és vaszkuláris szerveződés és limfoid kompartmentalizáció jellemző. Limfocita-felhalmozódásukban a limfociták egyrészt a szerozális felületi LYVE-1-pozitív makrofágokhoz, míg a vérkeringés felől a PNAd-pozitív érszegmentumokat bélelő endoteliális sejtekhez kötődhetnek, ezáltal elősegítve limfocita hatékony megtelepedését. A limfóma sejtek megtapadása és a szöveten belüli további migrációja során a (részleteiben egyelőre nem feltárt) kapcsolódásuk a



6.75. ábra: A LYVE-1-pozitív makrofágok szerepe a FLAg DLBCL sejtek szerozális megkötésében
Intraperitoneális oltást követően a CFSE-jelölt Bc.DLFL1 sejtek (zöld) a FLAg széli részén elhelyezkedő LYVE-1 pozitív (kék) makrofágokhoz kötődnek (**A**), majd a FLAg szöveten belül a fibronektin (Fn, vörös) kötegek mentén haladnak két órával az oltást követően (reprezentatív konfokális mikroszkópos felvétel). Klodronát-liposzóma oltás után a beadott XenoLight DiR-jelölt limfóma sejtek NIR fluoreszcens képalkotó eljárással (**B**) értékelt szerozális kötődése szignifikánsan csökken. PBS-tartalmú kontroll liposzóma nem változtatja meg a kötődés megoszlását (**C**) a csepleszben (nyílhegy) és a bélfodorban (nyíl). Klodronát-liposzóma kezelés a FLAg LYVE-1 pozitív makrofágjainak drasztikus csökkenését okozza (**D**), kontroll PBS liposzóma kezelés nem befolyásolja a LYVE-1 pozitív makrofágok (**E**) jelenlétét. A diagram a klodronát-liposzóma előkezelésnek a XenoLight DiR jelölt Bc.DLFL1 sejtek szerozális megkötődésére kifejtett kvantitatív hatását mutatja (**F**) a teljes fotonkibocsájtás értékek alapján ($n = 6$; átlag ± SEM, két párhuzamos mérésben; $*p < 0,05$). *Jia X, Gábris F, Jacobsen O, 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.*



6.76. ábra: A szerozális homing részleges L-szelektin függése

(**A**) Nem-fotokonvertált KikG (*fent, bal*) és konvertált KikR (*fent, középen*) nyirokcsomó limfociták és keverékük (*fent, jobb*) jól elkülöníthetők áramlási citometriával, az egyes kvadránsokban lévő sejt-gyakoriságot a diagramok jobb felső sarkában lévő számok jelzik. Az alsó sorban a diagramok a KikG sejtek MEL-14 előkezelésének a recipiens célszövetekben a KikG/KikR arányra kifejtett hatását mutatják az egyes Kik-jelölt sejtek gyakoriságának feltüntetésével. A MEL-14 előkezelésnek a limfocita szerozális megtapadás-gátlás hatékonyságát mutató diagramban (**B**) a gátlás mértéke a lép (minimális hatás) és a nyirokcsomó (maximális hatás) közötti intervallumban van (*n*= 3 egér/csoport, **p*<0,05). *Jia X, Gábris F, Jacobsen O, 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.*

mezenteriális nyirokutakhoz a limfoid sejtek perifériás megoszlásának fontos összetevője lehet, és jelentős szerepet játszhat a hasüregi daganatok terjedésében és távoli áttét-képzésében is (Jia és mtsai, 2020).

dc_1678_19

7. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MEGBESZÉLÉS

Az utóbbi idők kutatásai szerint a perifériás nyirokszövetek korábban viszonylag kevéssé vizsgált nem-hematopoetikus kötőszöveti összetevői az addigi, meglehetősen passzív statikus támasztó funkcióikkal ellentétben jóval összetettebb és fontosabb szerepeket töltenek be. Ezek a nyirokszövetek embrionális és posztnatális fejlődésében és érésüket követően az adaptív immunválaszok koordinálásában egyaránt megnyilvánulnak, felvetve az „immunofibroblast" elnevezést (Malhotra és mtsai, 2013; Nayar és mtsai, 2019; Perez-Shibayama és mtsai, 2019). A biológiai alapfolyamatok megértése mellett a perifériás nyirokszövetek fejlődésének részletesebb megismerése elősegítheti azon kórfolyamatok pontosabb értékelését és ezáltal a terápiás lehetőségeit bővítheti, amelyekben az ektópiás nyirokszövetképződés fontos összetevője a szövetkárosodásnak (Barone és mtsai, 2016; Majumder és mtsai, 2019). Bár a megkülönböztetésükre alkalmazható antitestek száma még jelenleg is a töredéke a fehérvérsejtek vizsgálatára alkalmazott immunreagensekének, az utóbbi idők módszertani fejlődésének (Brainbow/Confetti sejtvonal-specifikus klonális „fate mapping" és sejt-depléció, kombinált sejtfelszíni/CXCL12 és CCL19/21 kemokin-riporter kombináción alapuló sejtszeparálás és transzkriptom-analízis, stb.) eredményeképpen a stromális összetevőkre vonatkozó tudásunk rohamosan bővül (Fletcher és mtsai, 2011; Malhotra és mtsai, 2012; Rodda és mtsai, 2018). Ugyanakkor a hagyományos sejt-tisztítási eljárásokhoz továbbra is jórészben megfelelően jellemzett specifikus új antitestek előállítására van szükség, amire irányuló munkám eredményeit az értekezés első szakaszában foglaltam össze.

A nyirokszövet legkorábban azonosított nem-hematopoetikus összetevői a follikuláris dendritikus sejtek, melyeket jelenlegi tudásunk alapján helyi forrásból specializált szövetalkotónak tekintünk. Bár hasonló szövetépítő és immunológiai funkciókat látnak el, fejlődési útvonalaik a lép és nyirokcsomók között eltérő. Eredményeink szerint az FDC érése a posztnatális lépben sejtfelszíni marker-mintázata alapján meghatározható stádiumokra osztható. Ebben a funkcionális elköteleződést a CR1.2 markerek megjelenése jelzi (Balogh és mtsai, 2001), amihez a szükséges differenciációs szignált az FDC-prekurzor által termelt CXCL13 hatására a körülöttük megtelepedő B-sejtek nyújthatják. A lépben ez dominánsan B-sejt függő esemény, mely hatására a perivaszkuláris FDC/FRC prekurzorok a T/B kompartmentalizációt elősegítő CCL19/21 FRC és FDC alcsoporttá érnek (Schaeuble és mtsai, 2017). Ennek a folyamatnak a részeként a FRC átrendeződéshez az általuk kialakított conduit-rendszer posztnatális érése és átépülése kapcsolódik (Balogh és mtsai, 2004; Balogh és mtsai, 2008). Nyirokcsomó esetében a stróma-érése feltehetőleg nagyobb mértékben a LTi sejtek részvételével történik, és a velük kölcsönhatásban álló LTo prekurzorok a léptől eltérő differenciációs útvonal mentén fejlődnek (Denton és mtsai, 2019). Feltételezhető ugyanakkor, hogy a B-sejtes szignálok mellett a lép FDC és egyéb nem-endoteliális stróma-előalakok fejlődésében fontos transzkripcionális érési szabályozók eltérnek a nyirokcsomók hasonló összetevőiétől (Castagnaro és mtsai, 2013).

Mind a lép fehér pulpa, mind a nyirokcsomó fejlődésében közös morfogén szabályzó a LTαβ2/LTβR szignalizáció, ugyanakkor a vörös pulpa érése ettől független. Ennek a kompartmentnek az imunológiai szerepe, limfocita-homing folyamatai csak kevéssé ismertek, aminek további feltárásához az itt elhelyezkedő érszakaszok azonosítása és jellemzése (Balázs és mtsai, 2001; Tadayon és mtsai, 2019) is új ismereteket nyújthat.

A kialakult stróma megtartja dinamikus alkalmazkodási képességét, ami egyrészt az FDC adhéziós fehérjéinek csíracentrum reakció során bekövetkező mintázat-változásán keresztül is megfigyelhető, illetve új, egyelőre kevéssé feltárt alcsoportok is megjelenhetnek, amik átlépik a nyugvó nyirokszövetre jellemző T/B zonális elkülönülés határait (Mionnet és mtsai, 2013; Rodda és mtsai, 2015). Ez együtt járhat ezen sejtek által termelt conduit-szerveződés megváltozásával is, amire az általunk kifejlesztett IBL-10 antitest conduit-reaktivitásának T/B határterületi intenzitás-fokozódása utal (Balogh és mtsai, 2004). Korábbi adatok alapján az FDC LTαβ2-antagonista reagensekkel (LTβR-Ig vagy anti-LTβ antitest) kiváltott inaktiválása a humorális immunválaszt függeszti fel, míg a citotoxikus T-sejtes immunválaszban a FRC inaktiválása az immunválasz kialakulását akadályozta, de a már elkezdődött immunválaszt és az aktivált T-sejtek perzisztenciáját a nyirokcsomóban nem gátolta, a T-zóna conduit-rendszerének szétesése és az IL-7 képzés drasztikus csökkenése ellenére sem (Denton és mtsai, 2014).

A stróma fiziológiás funkció-vesztése elsősorban az öregedés során figyelhető meg, amely nem elsősorban számbeli csökkenés, hanem a stimulációs képesség hanyatlásával függhet össze, így pl. FDC esetében a kostimulációs ligandok orientációjával, FRC esetében az IL-7 termelésével és ECM/kollagén szintézis mértékével (Thompson és mtsai, 2017). A pontos stromális sejt-nyomonkövetés korlátai ugyanakkor jelentősen nehezítik a nem-hematopoetikus összetevők funkcionális károsodásának megítélését, és az önmagukban is összetett immunológiai események (pl. egy T-dependens antigénnel szembeni csíracentrum utáni memória immunválasz) időskori hanyatlásában szereplő stróma-komponensek funkcionális értékelését (Becklund és mtsai, 2016). Az FDC előalakok eredetének ismeretében és klonotípus–azonosító random fluoroprotein-kifejeződés felhasználásával (Jarjour és mtsai, 2014) lehetőség nyílik idős korban végzett FDC-dedifferentációs eljárással (Mackay és Browning, 1998) az FDC regeneráció esetleges defektusainak vizsgálatára és a regeneráció klonalitásának összehasonlítására. Ugyanakkor a lép és a nyirokcsomó FDC eredet-béli és fejlődéstani különbségeire tekintettel felmerül, hogy ezen regenerációs jellemzőkben nyirokszövet-típustól függően eltérések mutatkozhatnak.

A szövet-specifikus nyirokszöveti stromális morfogének egyike az általunk részletesen tanulmányozott Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor. Hiánya elsősorban a lép és Peyer plakkok szerkezetének megváltozását okozza (Wang és mtsai, 2000; Pabst és mtsai, 2000), amiben az elsődlegesen károsodott összetevő a vörös pulpa és a marginális zóna, ugyanakkor a lép fehér pulpa T/B kompartmentalizációja is károsodik. Jelenleg nem áll rendelkezésre olyan Nkx2-3 riporter gén konstrukciót kifejező egér-mutáns, ami révén a lép Nkx2-3-függő elemeit izolálhatnánk, ezért a tradicionális szerkezet-analízissel kerestük azokat az eltéréseket, amik összefüggésbe hozhatók az észlelt változásokkal. Eredményeink szerint az elváltozás legfon-

tosabb oka a lép ér-hálózatának nyirokcsomó-szerű komplex mintázat-váltása (Czömpöly és mtsai, 2011; Kellermayer és mtsai, 2011), ami alapján az Nkx2-3 faktort a nyirokcsomó ér-determináns represszorának tartjuk. Fontos párhuzamnak gondoljuk, hogy bár a humán és egér lép szerveződésében jelentős különbségek vannak (Steiniger, 2015), a humán lép vörös pulpájának szinusz-endotél alcsoportja általi Nkx2-3 expresszió (Kellermayer és mtsai, 2016) összevethető az Nkx2-3 hiányos egerek vörös pulpa szinusz-rendszerének súlyos defektusával (Balogh és mtsai, 2007). Figyelembe véve az Nkx2-3 vörös pulpára korlátozódó kifejeződését egyelőre nem ismert, hogy az FDC kimutatható jelenléte ellenére az Nkx2-3 mutáns lép fehér pulpájában milyen összetevő(k) zavara akadályozza meg a normál T/B-sejtes szegregációt.

Az Nkx2-3 hiányának elsődleges molekuláris következménye a Peyer-plakk limfoid homingját elősegítő MAdCAM-1 addresszin hiánya. Ennek ellenére Peyer-plakkok kialakulnak, amiben fontos szerepe van a MAdCAM-1 addresszin PNAd általi helyettesítésének (Kellermayer és mtsai, 2014). A Peyer plakkok megjelenése feltehetőleg az embrionális MAdCAM-1 átmenetileg fennmaradó posztnatális kifejeződéséhez köthető. A lép leukocita recirkulációjában a MAdCAM-1 nem játszik lényegi szerepet, illetve önmagának a MAdCAM-1 genomiális hiányának nincs lép-szöveti következménye (Schippers és mtsai, 2009), ennek ellenére az Nkx2-3 hiánya súlyos szerkezeti következménnyel jár. Ebből következően Nkx2-3 mutánsokban a lépben nem önmagának a MAdCAM-1 addresszin marginális szinusz endotél sejteken való kifejeződésének a hiánya, hanem más stromális sejttársaság(ok) érésének károsodása vezet az észlelt fenotípushoz, és hatása túlterjed a feltételezhető vörös pulpa/MZ territorialitáson, befolyásolva a fehér pulpa szerkezetét is. A MAdCAM-1 genomiális hiányával szemben viszont az Nkx2-3 továbbra is kifejti a PNAd/nyirokcsomó-szerű érpálya-képződést represszáló hatását, ezért a MAdCAM-1 mutánsokban a lép érmintázata nem alakul át nyirokcsomó-szerűvé.

A munkánk során használt kétféle kísérleti modellben a MAdCAM-1 hiányát létrehozó genetikai eltérések a nyirokszövet-indukcióban fontos mukózális LTi/ILC3 sejtek vékonybél és vastagbél szegmentumokban megfigyelt megoszlását és kísérleti vastagbélgyulladás súlyosságát is eltérően befolyásolják (Kellermayer és mtsai, 2019; Vojkovics és mtsai, 2019). Fontosnak gondolom, hogy a leírt addresszin-mintázat változások eltérő módon befolyásolták a kialakult fehérvérsejt homing kompenzációs mechanizmusok hatékonyságát, így a gyulladásos bélbetegség kezelésében felmerült anti-adhéziós (anti-α4β7/Vedolizumab) terápiák hatékonyságának és tartósságának értékelése feltétlenül további vizsgálatokat tesz szükségessé. Ennek tisztázását a bél nem-endoteliális Nkx2-3 expresszáló sejtjeinek az azonosítása és analízise segítheti elő. Csontvelői kiméra-kísérleteink eredményei szerint az Nkx2-3 szabályzó hatása ezekben a folyamatokban a nyirokszövetek nem-hematopoetikus összetevőiben érvényesül, ugyanakkor a hematopoetikus sejtekben bekövetkező kromoszomális transzlokációk következtében az Nkx2-3 ektópiás kifejeződése B-sejtes malignus limfómák megjelenéséhez vezethet (Robles és mtsai, 2016; Vojkovics és mtsai, 2018). További kutatás szükséges az Nkx2-3 transzkripciós faktort különböző szövetekben kifejező sejtek, valamint ezeken belül a potenciális célgének meghatározásához, különösképpen az intesztinális őssejt-mikrokörnyezet kialakításában és a bélhám regeneratív vagy daganatos folyamataiban játszott szerepének tisztázására (Hsia és mtsai, 2016).

Fontos megemlíteni, hogy az Nkx2-3 autonóm kifejeződése és célgén-szabályozása mellett önmaga is szabályozási célpont lehet. Ebben heterológ módon (a bél dendritikus sejtjeiből származó retinsav által fokozottan α4β7 integrint expresszáló, és ezáltal a bélbe lokalizálódó) T-sejtek az általuk termelt, és az Nkx2-3 mRNS-s célzó miRNS-t tartalmazó α4β7-pozitív exoszomák révén vehetnek részt. Ennek hatására a MAdCAM-1, VCAM-1 és ICAM-1 endoteliális adhéziós molekulák sejtfelszíni kifejeződése csökken, ezáltal korlátozva a mukózális limfocita-homing folyamatát (Park és mtsai, 2019).

A bél mukózális felületének immunológiai ellenőrzése és homeosztázisa régóta intenzív kutatások középpontjában áll, ugyanakkor a szerozális felülettel és a hasüreggel való kapcsolódása alig ismert. Korábbi megfigyelések a hasüregi B-1 sejteknek a mukózában elhelyezkedő IgA-termelő plazmasejtekké való átalakulását igazolták, ami a lép jelenlététől függ (Wardemann és mtsai, 2002; Pedersen és mtsai, 2018). Így felvetődik a lép-hasüreg-bél összehangolt együttes szerepe ezen sejtek képződésének, megoszlásának és funkcionális aktivitásának meghatározásában, ugyanakkor a résztvevő immunológiai kompartmentek közötti kapcsolódás részleteiről nincsenek adatok. Ennek elsődleges oka (a bél nyálkahártya-asszociált nyirokszövet kiterjedtsége és összetettsége mellett) a bonyolult hasüregi anatómiai elrendeződés, ami a nyirokszövetek szerkezeti és celluláris vizsgálatára alkalmazott szokványos immunológiai eljárásokkal nem, vagy csak nehezen értékelhető.

A nyirokszöveti stróma-szerveződés kutatása során egy véletlen megfigyelés vezetett el egy BALB/c egérben kialakult spontán B-sejtes malignus limfóma azonosításához és jellemzéséhez (Vojkovics és mtsai, 2016). A hasi nyirokcsomó és lép elsődleges érintettsége miatt relevánsnak véltem a bél és lép stróma-differenciálódási kutatásaim kiterjesztését a béltraktus szerozális oldalán bekövetkező normál B-sejtek és B-sejtes limfóma kötődésében részt vevő nyirokszöveti formációk tanulmányozására. Ennek során a cseplesz, hasi zsírkötegek és a zsigeri hashártya felületén új nyirokszöveti formációt azonosítottunk és írtunk le, amit Foliate Lymphoid Aggregate (FLAg) néven jelöltük. Eddigi eredményeink szerint ezek a struktúrák a cseplesz tejfoltok (MS - milky spots) és a zsírszövetben kialakuló zsír-asszociált limfoid csoportok (FALC – fat-associated lymphoid clusters) mellett azoknál komplexebb szerkezetű, részlegesen elkülönülő T/B zónát tartalmazó képletek (Jia és mtsai, 2020). Érdekes módon a MS és FALC struktúrákhoz képest a FLAg formációk jóval aktívabban vesznek részt a hasüregi limfociták/limfóma sejtek megkötésében. A cseplesz mellett (Berberich és mtsai, 2008) ezek a bélfodor-zsírszöveti képletek, illetve variánsaik fontos szerepet tölthetnek be a hasüregi limfociták fiziológiás megoszlásában.

A szerozális nyirokszövetek részletesebb vizsgálata és immunológiai jelentőségének megismerése az utóbbi időkben új lendületet vett (Bénézech és mtsai, 2015; Cruz-Migoni és Caamano, 2016). Ezen nem-konvenciális immunológiai kompartmentek további vizsgálata számos, az immunológiai jelentőségén túlmutató eredményekhez vezethet. Így az általunk leírt limfóma terjedésének mechanisztikus vizsgálata – megtapadási helyek, résztvevő sejtek, molekuláris összetevők - mellett ez a kísérleti rendszer további lehetőséget teremt egyéb kórtani események megismerésére is, így a zsírszövet tumor-támogató stromává való fokozatos átalakulásá-

nak vizsgálatára is (Gerber és mtsai, 2006; Sandoval és mtsai, 2013; Poloni és mtsai, 2015). Természetesen a modell transzlációs relevanciáját a FLAg-nek megfelelő képletek emberben való megjelenésének igazolása támaszthatja alá, amihez a FLAg képletek fejlődési jellemzőinek további megismerése szükséges.

dc_1678_19

8. ÚJ EREDMÉNYEK

1. Az egér lép endotél-alcsoportokkal szemben előállított patkány monoklonális antitestekkel kimutattuk, hogy a lépben a különböző limfoid régiók eltérő fenotípusú endotéllel bélelt érelemeket tartalmaznak, és ezek az eltérő vaszkuláris domének különböző pre- és posztnatális differenciálódási kinetikával rendelkeznek. A vörös pulpa érszegmensei a fenotípus-jellegzetességeik mellett *in vitro* ligand-kötési módszerekkel igazolhatóan részt vehetnek az albumin megkötésében és a vas-anyagcsere szabályozásában is.
2. Az egér lép kötőszöveti stróma-összetevőinek vizsgálatára kifejlesztett patkány monoklonális antitestekkel igazoltuk, hogy a lép fehér pulpa különböző részleteinek retikuláris alapállománya (FRC) szelektív immunológiai markerekkel és jelölési mintázattal jellemezhető, és ezek elrendeződése limfocita jelenlétet igényel.
3. Kimutattuk, hogy a lép follikuláris dendritikus sejtjei (FDC) a posztnatális időszakban egy jól leírható fenotípus-változás során szerzik meg az immunkomplex tartós megkötésének képességét, ami viszonylag kevés B-sejt jelenlétét igényli, és γ-sugárzásra, valamint az általa előidézett B-sejt deplécióra rezisztens.
4. Az egér lépben a T-dependens immunogénekkel történő immunizálás során kialakuló csíracentrum reakció egyik jellemző eseményeként leírtuk, hogy a VCAM-1 és MAdCAM-1 adhéziós molekulák indukálható módon kifejeződnek az FDC hálózaton, és ez az indukció a marginális zóna (MZ) stromális összetevőivel létrejövő folyamatos stróma-kompartment létrejöttét eredményezi.
5. Az immunológiai öregedés egyik összetevőjeként kimutattuk, hogy az idős FDC hálózat kostimulációs-aktivátor hatása az életkor előrehaladtával csökken, aminek egyik lehetséges oka a stimulátor vagy gátló szignál-keltő FDC-asszociált ligandumok eltérő prezentációs mechanizmusa az ITAM-tartalmú komplement-receptorok (CR1.2), illetve az ITIM-tartalmú CD16/32 FcγRII/RIII részvételével.
6. Leírtuk, hogy a MARCO scavenger receptor a lép MZ és a nyiroktüsző közötti szövet-specifikus kommunikációban a MZ eredetű MARCO az FDC-asszociált „conduit" hálózatba ágyazottan helyezkedik el, ami során a MARCO follikuláris bejutása érett MZ makrofágokat és FDC-indukcióra képes $CXCR5^+$ érett follikuláris B-sejteket igényel, de független a MZ B-sejtek S1PR1 által irányított follikuláris belépésétől.
7. Kimutattuk, hogy a lép MZ és FDC kialakulásában fontos morfogén szenzorként működő limfotoxin β-receptor (LTβR) közvetítette szignalizáció és a szövet-specifikus expressziót mutató Nkx2-3 homeodomén transzkripciós faktor a lép különböző régióinak érpálya-fejlődését irányítja, amiben a MZ ér-szegmentum közös irányítás alatt áll.
8. Bizonyítottuk, hogy az Nkx2-3 hiánya a lép szövet-specifikus érpálya-szerkezetének nyirokcsomó-szerű mintázat-váltását okozza, aminek eredményeképpen L-szelektin függő homing kapacitással rendelkező, magas endoteliális posztkapilláris venula (HEV) mRNS

profilt mutató PNAd-pozitív erek, valamint LYVE-1 nyirokendotél-markert hordozó nyiroktasakok jelennek meg. Ezen képletek LTβR-függő módon fejlődnek, ugyanakkor az Nkx2-3 hiánya nem transzformálja a mutáns lépet egy – a nyirokcsomókhoz hasonló - globálisan LTβR-függő szervvé.

9. Hasonló PNAd-indukciót igazoltunk a Peyer-plakkok (PP) HEV endotél sejtjein is Nkx2-3 hiányában, ugyanakkor feltételezhető, hogy az *Nkx2-3*$^{-/-}$ PP HEV-en keresztüli homing folyamatban egy nem-PNAd/MAdCAM-1 endoteliális receptor is részt vehet.

10. Kimutattuk, hogy a humán lépben az Nkx2-3-kifejeződést mutató CD31^{+}/CD34^{-}/vWF^{+} fenotípusú érelemek a vörös pulpában helyezkednek el, ami megfeleltethető az egér lép Nkx2-3 hiányban defektív fejlődést mutató vörös pulpa szinusz-összetevőinek. Ezzel ellentétben a humán bél lamina propria kötőszöveti-vaszkuláris elemei között az Nkx2-3 kifejeződés nem rendelhető (sejtvonal-markerekkel definiálható) egyféle szövetalkotóhoz.

11. Bizonyos humán MZ B-sejtes limfomákban fellépő IgH-Nkx2-3 kromoszomális transzlokáció modell-vizsgálatára kifejlesztett Eμ-*Nkx2-3* Tg transzgenikus egérmodellben megfigyeltük a lép szerkezetének fokozatos átépülését.

12. Igazoltuk, hogy a programozott (lép és PP) nyirokszövetek mellett a bél indukált nyirokszövet (SILT) fejlődése is károsodik Nkx2-3 hiányában, ami csak részben magyarázható a MAdCAM-1 transzkripcionális hiányával, ugyanakkor az Nkx2-3 hiánya protektív hatást fejt ki vastagbélgyulladás indukciója során. Ennek során jelentékeny eltérést figyeltünk meg a 3. típusú veleszületett limfoid (ILC3) és Treg összetételben és citokin-termelésben, ami a bél stromális sejtjei által közvetített módon az IL-22 citokin-termelődéstől függetlenül felelős lehet a gyulladással szembeni rezisztenciáért.

13. Bizonyítottuk, hogy az *Nkx2-3*$^{-/-}$ egérben kialakuló transzkripcionális és *Madcam1*$^{-/-}$ egérben meglévő genomiális MAdCAM-1 hiány eltérő módon befolyásolja a bél különböző szakaszainak ILC3 összetételét, és egyikük hiánya sem gátolja a perifériás nyirokcsomók differenciálódását, ami a nyirokszövet indukáló sejtek (LTi) embrionális megtapadását elősegítő MAdCAM-1:α4β7 integrin kapcsolódást helyettesítő mechanizmusra utal.

14. Egy spontán high-grade B-sejtes limfóma vizsgálata során kimutattuk, hogy a limfóma sejtek hasüregi oltást követően a mezenteriális zsírban haladó nyirokereken keresztül a hasi nyirokcsomóba jutnak.

15. Elsőként igazoltuk, hogy hasüregi oltásukat követően a B-sejtes limfóma és normál B-sejtek specifikus fokális kötődést mutatnak a vékonybelet és a csepleszt borító zsigeri hashártya különböző nyirokszöveti variánsaihoz. Ezek között jellemeztük az általunk foliate lymphoid aggregate (FLAg) névvel jelölt formációt. Ez az eddig leírt diffúz képletekkel ellentétben a megfelelő homeosztatikus kemokin-dominanciának megfelelően részleges T/B-kompartmentalizációt mutat. A FLAg-hoz való limfocita kapcsolódásban a hasüreg felől a LYVE-1 markert kifejező makrofágok vesznek részt, míg a vérárammal érkező sejtek részben L-szelektin-függő módon rövid PNAd-pozitív ereken keresztül jutnak el.

9. A DOLGOZAT ALAPJÁT ADÓ PUBLIKÁCIÓK

1. **Balogh P**, Horváth G, Szakal AK. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. J Histochem Cytochem. 2004 52:1287-98. IF: 2,513

2. **Balogh P**, Fisi V, Szakal AK. Fibroblastic reticular cells of the peripheral lymphoid organs: unique features of a ubiquitous cell type. Mol Immunol. 2008 46:1-7. IF: 3,555

3. Balázs M, Horváth G, Grama L, **Balogh P**. Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. Cell Immunol. 2001 212:126-37. IF: 2,604

4. Kellermayer Z, Hayasaka H, Kajtár B, Simon D, Robles EF, Martinez-Climent JA, **Balogh P**. Divergence of Vascular Specification in Visceral Lymphoid Organs-Genetic Determinants and Differentiation Checkpoints. Int Rev Immunol. 2016 35:489-502. IF: 3,279

5. **Balogh P**, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK. Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. Cell Immunol. 2001 214:45-53. IF: 2,604

6. **Balogh P**, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK. Appearance and phenotype of murine follicular dendritic cells expressing VCAM-1. Anat Rec. 2002 268:160-8. IF: 1,587

7. Aydar Y, **Balogh P**, Tew JG, Szakal AK. Age-related depression of FDC accessory functions and CD21 ligand-mediated repair of co-stimulation. Eur J Immunol. 2002 32:2817-26. IF: 4,832

8. Aydar Y, **Balogh P**, Tew JG, Szakal AK. Altered regulation of Fc gamma RII on aged follicular dendritic cells correlates with immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif signaling in B cells and reduced germinal center formation. J Immunol. 2003 171:5975-87. IF: 6,702

9. Szakal AK, Aydar Y, **Balogh P**, Tew JG. Molecular interactions of FDCs with B cells in aging. Semin Immunol. 2002 14:267-74. IF: 8,705

10. Aydar Y, **Balogh P**, Tew JG, Szakal AK. Follicular dendritic cells in aging, a „bottle-neck" in the humoral immune response. Ageing Res Rev. 2004 3:15-29. IF: 4,953

11. Kellermayer Z, Fisi V, Mihalj M, Berta G, Kóbor J, **Balogh P**. Marginal Zone Macrophage Receptor MARCO Is Trapped in Conduits Formed by Follicular Dendritic Cells in the Spleen. J Histochem Cytochem. 2014 62:436-449. IF: 1,959

12. **Balogh P**, Balázs M, Czömpöly 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 328:473-86. IF: 2,613

13. Czömpöly T, Lábadi 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 186:6981-9. IF: 5,788

14. Kellermayer Z, Lábadi A, Czömpöly 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. IF: 2,725

15. Kellermayer Z, Mihalj M, Lábadi Á, Czömpöly T, Lee M, O'Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, **Balogh P**. 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. IF: 4,922

16. Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, **Balogh P**. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844. IF: 4,718

17. Vojkovics D, Kellermayer Z, Gábris F, Schippers A, Wagner N, Berta G, Farkas K, **Balogh P**. 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:4,716

18. Vojkovics D, Kellermayer Z, Kajtár B, Roncador G, Vincze Á, **Balogh P**. Nkx2-3-A Slippery Slope From Development Through Inflammation Toward Hematopoietic Malignancies. Biomark Insights. 2018 13:1177271918757480.

19. Robles EF, Mena-Varas M, Barrio L, Merino-Cortes SV, **Balogh P**, Du MQ, Akasaka T, Parker A, Roa S, Panizo C, Martin-Guerrero I, Siebert R, Segura V, Agirre X, Macri-Pellizeri L, Aldaz B, Vilas-Zornoza A, Zhang S, Moody S, Calasanz MJ, Tousseyn T, Broccardo C, Brousset P, Campos-Sanchez E, Cobaleda C, Sanchez-Garcia I, Fernandez-Luna JL, Garcia-Muñoz R, Pena E, Bellosillo B, Salar A, Baptista MJ, Hernandez-Rivas JM, Gonzalez M, Terol MJ, Climent J, Ferrandez A, Sagaert X, Melnick AM, Prosper F, Oscier DG, Carrasco YR, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. Homeobox NKX2-3 promotes marginal-zone lymphomagenesis by activating B-cell receptor signalling and shaping lymphocyte dynamics. Nat Commun. 2016 14 7:11889. IF:12,124

20. Vojkovics D, Kellermayer Z, Heidt D, Mihalj M, Kajtár B, Ernszt D, Kovács T, Németh P, **Balogh P**. 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 22:421-30. IF: 1,736

21. Jia X, Gábris F, Jacobsen O, 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.

9.1 A témában megjelent további közlemények

22. Balázs M, Horváth G, **Balogh P**. Simple determination of donor/host origin and donor leukocyte subsets in rat-mouse chimeras. J Immunol Methods. 1998 218:117-21. IF: 1,855

23. Balázs M, Grama L, **Balogh P**. Detection of phenotypic heterogeneity within the murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies IBL-7/1 and IBL-7/22. Hybridoma. 1999 18:177-82. IF: 0,509

24. Czömpöly T, Lábadi A, Balázs M, Németh P, **Balogh P**. Use of cyclic peptide phage display library for the identification of a CD45RC epitope expressed on murine B cells and their precursors. Biochem Biophys Res Commun. 2003 307:791-6. IF: 2,836

25. Mok H, Mendoza M, Prchal JT, **Balogh P**, Schumacher A. Dysregulation of ferroportin 1 interferes with spleen organogenesis in polycythaemia mice. Development. 2004 131:4871-81. IF:7,149

26. **Balogh P**, Petz A. Selective binding of biotinylated albumin to the lymphoid microvasculature. Histochem Cell Biol. 2005 123:357-63. IF: 2,239

27. Kvell K, Czömpöly T, Pikkarainen T, **Balogh P**. Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 2006 341:1193-202. IF: 2,855

28. Bovári J, Czömpöly T, Olasz K, Arnold HH, **Balogh P.** Complex organizational defects of fibroblast architecture in the mouse spleen with Nkx2.3 homeodomain deficiency. Pathol Oncol Res. 2007 13:227-35. IF: 1,272

29. Lábadi A, **Balogh P**. Differential preferences in serosal homing and distribution of peritoneal B-cell subsets revealed by in situ CFSE labeling. Int Immunol. 2009 21:1047-56. IF: 3,403

30. Kvell K, Czömpöly T, Hiripi L, **Balogh P**, Kóbor J, Bodrogi L, Pongrácz JE, Ritchie WA, Bosze Z. Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis. Transgenic Res. 2010 19:105-12. IF: 2,569

31. Mihalj M, Kellermayer Z, **Balogh P**. Follicles in gut-associated lymphoid tissues create preferential survival niches for follicular Th cells escaping Thy-1-specific depletion in mice. Int Immunol. 2013 25:423-35. IF: 3,181

32. Novak S, Drenjancevic I, Vukovic R, Kellermayer Z, Cosic A, Tolusic Levak M, **Balogh P**, Culo F, Mihalj M. Anti-Inflammatory Effects of Hyperbaric Oxygenation during DSS-Induced Colitis in BALB/c Mice Include Changes in Gene Expression of HIF-1α, Proinflammatory Cytokines, and Antioxidative Enzymes. Mediators Inflamm. 2016 2016:7141430. IF: 3,232

33. Kellermayer Z, Vojkovics D, **Balogh P**. Innate lymphoid cells and their stromal microenvironments. Immunol Lett. 2017 189:3-9. IF: 2,439

34. Kugyelka R, Kohl Z, Olasz K, Prenek L, Berki T, **Balogh P**, Boldizsár F. Correction of T cell deficiency in ZAP-70 knock-out mice by simple intraperitoneal adoptive transfer of thymocytes. Clin Exp Immunol. 2018 192:302-314. IF: 3,711

35. Boros É, Kellermayer Z, **Balogh P**, Strifler G, Vörös A, Sarlós P, Vincze Á, Varga C, Nagy I. Elevated Expression of AXL May Contribute to the Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Inflammatory Bowel Disease Patients. Mediators Inflamm. 2018 2018:3241406. IF: 3,545

36. Developmental Biology of Peripheral Lymphoid Organs (2011). Ed. **Balogh P**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg ISBN 978-3-642-14429-5

37. **Balogh, P**. Follicular Dendritic Cells Péter Balogh Springer Nature Switzerland AG 2019D. Gu, M. E. Dupre (eds.), Encyclopedia of Gerontology and Population Aging,DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-69892-2_65-1

A témában megjelent közlemények összesített impakt faktora: 123,428

9.2 Tudománymetriai adatok

Tudományos folyóiratcikkek száma: 60

Könyvfejezetek száma: 9

Könyv (szerkesztés): 1

Összesített impakt faktor: 165,15

Első és utolsó szerzős közlemények impakt faktora: 91,50

Utolsó 10 év teljes lektorált közlemények száma: 28

Impakt faktora: 92,51

Összes hivatkozások száma: 770

Független hivatkozások száma: 567

Hirsch index: 15

dc_1678_19

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az értekezésben bemutatott eredmények csak része mindannak a fáradozásnak, küzdelemnek, örömnek és kudarcnak, ami nélkül nem lett volna lehetőségem akár csak a munka elkezdésére, siker esetén az önmérséklésre, kudarcban az erőgyűjtésre és újrakezdésre. Ehhez a legnagyobb biztonságot, szeretetet, türelmet és megértést a feleségemtől, Andreától és gyermekeimtől, Orsolyától és Bendegúztól kaptam, akik leginkább megszenvedhették a nekik hazavitt gondjaimat és a tőlük elvett időt.

Egykori TDK-s hallgatóként a POTE Kórbonctani Intézetében hajdani témavezetőmnek és hosszú ideig munkahelyi vezetőmnek, Dr. Németh Péternek majd Dr. Szekeres Györgynek és munkatársaiknak, Melczer Juditnak és Pápa Marikának (†) köszönöm meg, hogy lehetőséget adtak a munkámhoz, és elviselték kezdeti botladozásaimat.

Külföldi munkahelyeimen vezetőim, a University of Oxford, Sir William Dunn School of Pathology intézetben Dr. Simon V. Hunt (a British Council és a Sir Penley Abraham Foundation támogatásával), később Richmondban a Virginia Commonwealth University, Department of Anatomy immunológiai kutatócsoportjában Dr. Andras K. Szakal (Szakál András) segített hozzá, hogy immunológiai ismereteimet új tudással bővíthessem.

A legnagyobb kutatói segítséget azon fiatalok fáradhatatlan hozzájárulása nyújtotta, akiket TDK hallgatóként és később PhD hallgatóként mentorálhattam – Dr. Balázs Mercédesz, Dr. Kvell Krisztián, Dr. Lábadi Árpád, Dr. Vojkovics Dóra, Dr. Martina Mihalj és különösen Dr. Kellermayer Zoltán, akit a tudomány iránti elkötelezettségével, kitartó munkájával és önzetlenségével, ugyanakkor nyitott és kritikus szemléletével a hazai immunológiai kutatás egyik legígéretesebb személyiségének tartok. Együttműködő partnereim közül szintén szeretném megköszönni Dr. Czömpöly Tamásnak, hogy a molekuláris biológiai módszertanban való kiemelkedő felkészültségével alapos és értékes segítséget nyújtott a munkámban. A kutatásaim folytatásában nyújtott értékes segítségükért a PTE KK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet minden munkatársának tartozom köszönettel.

A kutatásaimat az OTKA ifjúsági (#F016695 és #F023567) és kutatói (#K108429 és #K128322) támogatásai, valamint az ETT és a Broad Medical Foundation (#IBD-0341) támogatása tették lehetővé.

dc_1678_19

11. IRODALOMJEGYZÉK

Abe Y, Minegishi T, Leung PC. Activin receptor signaling. Growth Factors. 2004 22:105-10.

Adachi S, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S. Three distinctive steps in Peyer's patch formation of murine embryo. Int Immunol. 1997 9:507-14.

Adachi S, Yoshida H, Honda K, Maki K, Saijo K, Ikuta K, Saito T, Nishikawa SI. Essential role of IL-7 receptor alpha in the formation of Peyer's patch anlage. Int Immunol. 1998 10:1-6.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol. 2003 3:745-56.

Aird WC, Jahroudi N, Weiler-Guettler H, Rayburn HB, Rosenberg RD. Human von Willebrand factor gene sequences target expression to a subpopulation of endothelial cells in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 92:4567-71.

Akiyama T, Shinzawa M, Qin J, Akiyama N. Regulations of gene expression in medullary thymic epithelial cells required for preventing the onset of autoimmune diseases. Front Immunol. 2013 Aug 26;4:249. doi: 10.3389/fimmu.2013.00249.

Alimzhanov MB, Kuprash DV, Kosco-Vilbois MH, Luz A, Turetskaya RL, Tarakhovsky A, Rajewsky K, Nedospasov SA, Pfeffer K. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 94:9302-7.

Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, Browning JL, Lipp M, Cyster JG. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. Nature. 2000 406:309-14.

Ansel KM, Harris RB, Cyster JG. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. Immunity. 2002 16:67-76.

Aparicio-Domingo P, Romera-Hernandez M, Karrich JJ, Cornelissen F, Papazian N, Lindenbergh-Kortleve DJ, Butler JA, Boon L, Coles MC, Samsom JN, Cupedo T. Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage. J Exp Med. 2015 212:1783-91.

Apelqvist A, Ahlgren U, Edlund H. Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. Curr Biol. 1997 7:801-4.

Arnon TI, Xu Y, Lo C, Pham T, An J, Coughlin S, Dorn GW, Cyster JG. GRK2-dependent S1PR1 desensitization is required for lymphocytes to overcome their attraction to blood. Science. 2011 333:1898-903.

Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K, Kobzik L. The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. J Exp Med. 2004 200:267-72.

Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. Nature. 2015 517:293-301.

Astrakhan A, Omori M, Nguyen T, Becker-Herman S, Iseki M, Aye T, Hudkins K, Dooley J, Farr A, Alpers CE, Ziegler SF, Rawlings DJ. Local increase in thymic stromal lymphopoietin induces systemic alterations in B cell development. Nat Immunol. 2007 8:522-31.

Aydar Y, Balogh P, Tew JG, Szakal AK. Age-related depression of FDC accessory functions and CD21 ligand-mediated repair of co-stimulation. Eur J Immunol. 2002 32:2817-26.

Aydar Y, Balogh P, Tew JG, Szakal AK. Altered regulation of Fc gamma RII on aged follicular dendritic cells correlates with immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif signaling in B cells and reduced germinal center formation. J Immunol. 2003 171:5975-87.

Aydar Y, Balogh P, Tew JG, Szakal AK. Follicular dendritic cells in aging, a "bottle-neck" in the humoral immune response. Ageing Res Rev. 2004 3:15-29.

Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, Germain RN. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. Immunity. 2006 25:989-1001.

Bajénoff M, Glaichenhaus N, Germain RN. Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. J Immunol. 2008 181:3947-54.

Bajénoff M, Germain RN. B-cell follicle development remodels the conduit system and allows soluble antigen delivery to follicular dendritic cells. Blood. 2009 114:4989-97.

Balázs M, Horváth G, Balogh P. Simple determination of donor/host origin and donor leukocyte subsets in rat-mouse chimeras. J Immunol Methods. 1998 218:117-21.

Balázs M, Grama L, Balogh P. Detection of phenotypic heterogeneity within the murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies IBL-7/1 and IBL-7/22. Hybridoma. 1999 18:177-82.

Balázs M, Horváth G, Grama L, Balogh P. Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. Cell Immunol. 2001 212:126-37.

Balogh P, Bebök Z, Németh P. Cellular enzyme-linked immunocircle assay. A rapid assay of hybridomas produced against cell surface antigens. J Immunol Methods. 1992 153:141-9.

Balogh P, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK. Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. Cell Immunol. 2001 214:45-53.

Balogh P, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK. Appearance and phenotype of murine follicular dendritic cells expressing VCAM-1. Anat Rec. 2002 268:160-8.

Balogh P, Horváth G, Szakal AK. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. J Histochem Cytochem. 2004 52:1287-98.

Balogh P, Petz A. Selective binding of biotinylated albumin to the lymphoid microvasculature. Histochem Cell Biol. 2005 123:357-63.

Balogh P, Balázs M, Schumacher A, Weih F, Arnold HH: Ontogeny and postnatal development of the splenic vascular beds: regional cues, phenotypic responses. In: Embryonic Stem Cell Research, Stem Cells - Laboratory and Clinical Research (Nova Sciences Inc, Ed Greer, Erik V) 2006, pp. 143-169.

Balogh P, Balázs M, Czömpöly 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 328:473-86.

Balogh P, Fisi V, Szakal AK. Fibroblastic reticular cells of the peripheral lymphoid organs: unique features of a ubiquitous cell type. Mol Immunol. 2008 46:1-7.

Balogh P, Lábadi Á. Structural evolution of the spleen in man and mouse. In: Developmental Biology of Peripheral Lymphoid Organs (Springer Verlag Berlin Heidelberg, Ed. Péter Balogh) 2011, pp. 121-141.

Balogh, P. Follicular Dendritic Cells Péter Balogh Springer Nature Switzerland AG 2019D. Gu, M. E. Dupre (eds.), Encyclopedia of Gerontology and Population Aging,DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-69892-2_65-1

Banks TA, Rouse BT, Kerley MK, Blair PJ, Godfrey VL, Kuklin NA, Bouley DM, Thomas J, Kanangat S, Mucenski ML. Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. J Immunol. 1995 55:1685-93.

Bannard O, Cyster JG. Germinal centers: programmed for affinity maturation and antibody diversification. Curr Opin Immunol. 2017 45:21-30.

Barone F, Gardner DH, Nayar S, Steinthal N, Buckley CD, Luther SA. Stromal Fibroblasts in Tertiary Lymphoid Structures: A Novel Target in Chronic Inflammation. Front Immunol. 2016 Nov 8;7:477. eCollection

Becklund BR, Purton JF, Ramsey C, Favre S, Vogt TK, Martin CE, Spasova DS, Sarkisyan G, LeRoy E, Tan JT, Wahlus H, Bondi-Boyd B, Luther SA, Surh CD. The aged lymphoid tissue environment fails to support naïve T cell homeostasis. Sci Rep. 2016 6:30842.

Bénézech C, Luu NT, Walker JA, Kruglov AA, Loo Y, Nakamura K, Zhang Y, Nayar S, Jones LH, Flores-Langarica A, McIntosh A, Marshall J, Barone F, Besra G, Miles K, Allen JE, Gray M, Kollias G, Cunningham AF, Withers DR, Toellner KM, Jones ND, Veldhoen M, Nedospasov SA, McKenzie ANJ, Caamaño JH. Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. Nat Immunol. 2015 16:819-828.

Berberich S, Dähne S, Schippers A, Peters T, Müller W, Kremmer E, Förster R, Pabst O. Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots. J Immunol. 2008 180:2196-203.

Bertrand JY, Desanti GE, Lo-Man R, Leclerc C, Cumano A, Golub R. Fetal spleen stroma drives macrophage commitment. Development. 2006 133:3619-28.

Birjandi SZ, Ippolito JA, Ramadorai AK, Witte PL. Alterations in marginal zone macrophages and marginal zone B cells in old mice. J Immunol. 2011 186:3441-51.

Boden EK, Snapper SB. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. Curr Opin Gastroenterol. 2008 24:733-41.

Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends Biochem Sci. 2002 27:19-26.

Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, Eberl G. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. Nature. 2008 456:507-10.

Bovári J, Czömpöly T, Olasz K, Arnold HH, Balogh P. Complex organizational defects of fibroblast architecture in the mouse spleen with Nkx2.3 homeodomain deficiency. Pathol Oncol Res. 2007 13:227-35.

Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K, Kerjaschki D. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. Am J Pathol. 1999 154:385-94.

Brendolan A, Ferretti E, Salsi V, Moses K, Quaggin S, Blasi F, Cleary ML, Selleri L. A Pbx1-dependent genetic and transcriptional network regulates spleen ontogeny. Development. 2005 132:3113-26.

Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN. Development and function of the mammalian spleen. Bioessays. 2007 29:166-77.

Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 87:3127-31

Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP, Hession C, O'Brine-Greco B, Foley SF, Ware CF. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. Cell. 1993 72:847-56.

Browning JL, Dougas I, Ngam-ek A, Bourdon PR, Ehrenfels BN, Miatkowski K, Zafari M, Yampaglia AM, Lawton P, Meier W, et al. Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of specific monoclonal antibodies and soluble receptors. J Immunol. 1995 154:33-46.

Browning JL, French LE. Visualization of lymphotoxin-beta and lymphotoxin-beta receptor expression in mouse embryos. J Immunol. 2002 168:5079-87.

Browning JL, Allaire N, Ngam-Ek A, Notidis E, Hunt J, Perrin S, Fava RA. Lymphotoxin-beta receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. Immunity. 2005 23:539-50.

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.

Burn SF, Boot MJ, de Angelis C, Doohan R, Arques CG, Torres M, Hill RE. The dynamics of

spleen morphogenesis. Dev Biol. 2008 318:303-11.

Cao X, Shores EW, Hu-Li J, Anver MR, Kelsall BL, Russell SM, Drago J, Noguchi M, Grinberg A, Bloom ET, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. Immunity. 1995 2:223-38.

Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. Nature. 1996 383:443-6.

Castagnaro L, Lenti E, Maruzzelli S, Spinardi L, Migliori E, Farinello D, Sitia G, Harrelson Z, Evans SM, Guidotti LG, Harvey RP, Brendolan A. Nkx2-5(+)islet1(+) mesenchymal precursors generate distinct spleen stromal cell subsets and participate in restoring stromal network integrity. Immunity. 2013 38:782-91.

Castro A, Bono MR, Simon V, Vargas L, Rosemblatt M. Spleen-derived stromal cells. Adhesion molecules expression and lymphocyte adhesion to reticular cells. Eur J Cell Biol. 1997 74:321-8.

Chen Y, Pikkarainen T, Elomaa O, Soininen R, Kodama T, Kraal G, Tryggvason K. Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. J Immunol. 2005 175:8173-80.

Chen Y, Sankala M, Ojala JR, Sun Y, Tuuttila A, Isenman DE, Tryggvason K, Pikkarainen T. A phage display screen and binding studies with acetylated low density lipoprotein provide evidence for the importance of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain in the ligand-binding function of MARCO. J Biol Chem. 2006 281:12767-75.

Chen Y, Yu M, Podd A, Wen R, Chrzanowska-Wodnicka M, White GC, Wang D. A critical role of Rap1b in B-cell trafficking and marginal zone B-cell development. Blood. 2008 111:4627-36.

Cherfils-Vicini J, Vingert B, Varin A, Tartour E, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Régnier CH, Cremer I. Characterization of immune functions in TRAF4-deficient mice. Immunology. 2008 124:562-74.

Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol. 2008 8:458-66.

Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW Jr, Cyster JG. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. Nat Immunol. 2008 9:54-62.

Crowe PD, VanArsdale TL, Walter BN, Ware CF, Hession C, Ehrenfels B, Browning JL, Din WS, Goodwin RG, Smith CA. A lymphotoxin-beta-specific receptor. Science. 1994 264:707-10.

Crowley MT, Reilly CR, Lo D. Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen. J Immunol. 1999 163:4894-900.

Cruz-Migoni S, Caamaño J. Fat-Associated Lymphoid Clusters in Inflammation and Immunity. Front Immunol. 2016 Dec 21;7:612.

Cuff CA, Schwartz J, Bergman CM, Russell KS, Bender JR, Ruddle NH. Lymphotoxin alpha3 induces chemokines and adhesion molecules: insight into the role of LT alpha in inflammation and lymphoid organ development. J Immunol. 1998 Dec 15;161(12):6853-60.

Cupedo T, Vondenhoff MF, Heeregrave EJ, De Weerd AE, Jansen W, Jackson DG, Kraal G, Mebius RE. Presumptive lymph node organizers are differentially represented in developing mesenteric and peripheral nodes. J Immunol. 2004 Sep 1;173(5):2968-75.

Cupedo T, Jansen W, Kraal G, Mebius RE. Induction of secondary and tertiary lymphoid structures in the skin. Immunity. 2004 Nov;21(5):655-67.

Cupedo T, Lund FE, Ngo VN, Randall TD, Jansen W, Greuter MJ, de Waal-Malefyt R, Kraal G, Cyster JG, Mebius RE. Initiation of cellular organization in lymph nodes is regulated by non-B cell-derived signals and is not dependent on CXC chemokine ligand 13. J Immunol. 2004 Oct 15;173(8):4889-96.

Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. Annu Rev Immunol. 2005;23:127-59.

Czömpöly T, Lábadi 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 Jun 15;186(12):6981-9.

Dear TN, Colledge WH, Carlton MB, Lavenir I, Larson T, Smith AJ, Warren AJ, Evans MJ, Sofroniew MV, Rabbitts TH. The Hox11 gene is essential for cell survival during spleen development. Development. 1995 Sep;121(9):2909-15.

Denton AE, Roberts EW, Linterman MA, Fearon DT. Fibroblastic reticular cells of the lymph node are required for retention of resting but not activated CD8+ T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Aug 19;111(33):12139-44. doi: 10.1073/pnas.1412910111. Epub 2014 Aug 4. PubMed PMID: 25092322; PubMed Central PMCID: PMC4143042.

Denton AE, Carr EJ, Magiera LP, Watts AJB, Fearon DT. Embryonic FAP(+) lymphoid tissue organizer cells generate the reticular network of adult lymph nodes. J Exp Med. 2019 Jul 19. pii: jem.20181705. doi: 10.1084/jem.20181705.

Deonarain R, Verma A, Porter AC, Gewert DR, Platanias LC, Fish EN. Critical roles for IFN-beta in lymphoid development, myelopoiesis, and tumor development: links to tumor necrosis factor alpha. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 11;100(23):13453-8.

De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, Streeter PR, Fick A, Mariathasan S, Smith 0SC, Carlson R, Shornick LP, Strauss-Schoenberger J, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. Science. 1994 Apr 29;264(5159):703-7.

Dias S, Silva H Jr, Cumano A, Vieira P. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. J Exp Med. 2005 Mar 21;201(6):971-9.

Doisne JM, Becourt C, Amniai L, Duarte N, Le Luduec JB, Eberl G, Benlagha K. Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)t+ and respond preferentially under inflammatory conditions. J Immunol. 2009 183:2142-9.

Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. Genes Dev. 1999 13:2412-24.

Drayton DL, Ying X, Lee J, Lesslauer W, Ruddle NH. Ectopic LT alpha beta directs lymphoid organ neogenesis with concomitant expression of peripheral node addressin and a HEV-restricted sulfotransferase. J Exp Med. 2003 197:1153-63.

Eberl G, Littman DR. The role of the nuclear hormone receptor RORgammat in the development of lymph nodes and Peyer's patches. Immunol Rev. 2003 195:81-90.

Eberl G, Littman DR. Thymic origin of intestinal alphabeta T cells revealed by fate mapping of RORgammat+ cells. Science. 2004 305:248-51.

Eberl G, Marmon S, Sunshine MJ, Rennert PD, Choi Y, Littman DR. An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. Nat Immunol. 2004 5:64-73.

Ellyard JI, Avery DT, Mackay CR, Tangye SG. Contribution of stromal cells to the migration, function and retention of plasma cells in human spleen: potential roles of CXCL12, IL-6 and CD54. Eur J Immunol. 2005 35:699-708.

Elomaa O, Kangas M, Sahlberg C, Tuukkanen J, Sormunen R, Liakka A, Thesleff I, Kraal G, Tryggvason K. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. Cell. 1995 80:603-9.

El Shikh ME, El Sayed RM, Wu Y, Szakal AK, Tew JG. TLR4 on follicular dendritic cells: an activation pathway that promotes accessory activity. J Immunol. 2007 179:4444-50.

Evans SM, Yan W, Murillo MP, Ponce J, Papalopulu N. tinman, a Drosophila homeobox gene required for heart and visceral mesoderm specification, may be represented by a family of genes in vertebrates: XNkx-2.3, a second vertebrate homologue of tinman. Development. 1995 121:3889-99

Ferguson AR, Youd ME, Corley RB. Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. Int Immunol. 2004 16:1411-22.

Finke D, Acha-Orbea H, Mattis A, Lipp M, Kraehenbuhl J. CD4+CD3- cells induce Peyer's patch development: role of alpha4beta1 integrin activation by CXCR5. Immunity. 2002 17:363-73.

Fisher S, Tremelling M, Anderson C, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott N, Nimmo E, Massey D, Berzuini C, and Johnson C. et al. Genetic Determinants of Ulcerative Colitis Include the ECM1 Locus and Five loci Implicated in Crohn's disease. Nat Gen. 2018; 40, 710-712.

Fletcher AL, Malhotra D, Acton SE, Lukacs-Kornek V, Bellemare-Pelletier A, Curry M, Armant M, Turley SJ. Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. Front Immunol. 2011 Sep 12;2:35. doi: 10.3389/fimmu.2011.00035.

Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. Cell. 1996 87:1037-47.

Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. Cell. 1999 99:23-33.

Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. Nat Rev Immunol. 2008 8:362-71.

Fu YX, Huang G, Wang Y, Chaplin DD. B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin alpha-dependent fashion. J Exp Med. 1998 187:1009-18.

Fu YX, Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. Annu Rev Immunol. 1999;17:399-433.

Fütterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. Immunity. 1998 9:59-70.

Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. Nature. 1983 304:30-4.

Gao JX, Madrenas J, Zeng W, Zhong R, Grant D. Generation of dendritic cell-like antigen-presenting cells in long-term mixed leucocyte culture: phenotypic and functional studies. Immunology. 1997 91:135-44.

Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, Molnar A, Wu P, Winandy S, Sharpe A. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. Cell. 1994 79:143-56.

Gerber SA, Rybalko VY, Bigelow CE, Lugade AA, Foster TH, Frelinger JG, Lord EM. 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. 2006 169:1739-52.

Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV, Fleming MP, Rust N, Singh B, Mortensen NJ, Travis SP, Powrie F. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. J Exp Med. 2011 208:1127-33.

Ghosh S, Gregory D, Smith A, Kobzik L. MARCO regulates early inflammatory responses against influenza: a useful macrophage function with adverse outcome. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 45:1036-44.

Girkontaite I, Sakk V, Wagner M, Borggrefe T, Tedford K, Chun J, Fischer KD. The sphingosine-1-phosphate (S1P) lysophospholipid receptor S1P3 regulates MAdCAM-1+ endothelial cells in splenic marginal sinus organization. J Exp Med. 2004 200:1491-501.

Gommerman JL, Browning JL. Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. Nat Rev Immunol. 2003 3:642-55.

Gonzalez M, Mackay F, Browning JL, Kosco-Vilbois MH, Noelle RJ. The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. J Exp Med. 1998 187:997-1007.

Gordon EJ, Gale NW, Harvey NL. Expression of the hyaluronan receptor LYVE-1 is not restricted to the lymphatic vasculature; LYVE-1 is also expressed on embryonic blood vessels. Dev Dyn. 2008 237:1901-9.

Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, Leung DW, Moffat B, Ng P, Svedersky LP, et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. Nature. 1984 312:721-4.

Grayson MH, Hotchkiss RS, Karl IE, Holtzman MJ, Chaplin DD. Intravital microscopy comparing T lymphocyte trafficking to the spleen and the mesenteric lymph node. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 284:H2213-26.

Green MC. A defect of the splanchnic mesoderm caused by the mutant gene dominant hemimelia in the mouse. Dev Biol. 1967 15:62-89.

Gretz JE, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Sophisticated strategies for information encounter in the lymph node: the reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic. J Immunol. 1996 157:495-9.

Guinamard R, Okigaki M, Schlessinger J, Ravetch JV. Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. Nat Immunol. 2000 1:31-6.

Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 95:258-63.

Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. Nature. 1998 391:799-803.

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 110:2381-9.

Ha H, Han D, Choi Y. TRAF-mediated TNFR-family signaling. Curr Protoc Immunol. 2009 Nov;Chapter 11:Unit11.9D. doi: 10.1002/0471142735.im1109ds87.

Hanna MG Jr, Szakal AK. Localization of 125I-labeled antigen in germinal centers of mouse spleen: histologic and ultrastructural autoradiographic studies of the secondary immune reaction. J Immunol. 1968 101:949-62.

Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, Zou YR, Littman DR, Cyster JG. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. J Exp Med. 2001 194:45-56.

Hashi H, Yoshida H, Honda K, Fraser S, Kubo H, Awane M, Takabayashi A, Nakano H, Yamaoka Y, Nishikawa S. Compartmentalization of Peyer's patch Anlagen Before Lymphocyte eEntry. J Immunol. 2001 166:3702-9.

Hecksher-Sørensen J, Watson RP, Lettice LA, Serup P, Eley L, De Angelis C, Ahlgren U, Hill RE. The splanchnic mesodermal plate directs spleen and pancreatic laterality, and is regulated by Bapx1/Nkx3.2. Development. 2004 131:4665-75.

Hemmerich S, Bistrup A, Singer MS, van Zante A, Lee JK, Tsay D, Peters M, Carminati JL, Brennan TJ, Carver-Moore K, Leviten M, Fuentes ME, Ruddle NH, Rosen SD. Sulfation of L-selectin ligands by an HEV-restricted sulfotransferase regulates lymphocyte homing to lymph nodes. Immunity. 2001 15:237-47.

Honda K, Nakano H, Yoshida H, Nishikawa S, Rennert P, Ikuta K, Tamechika M, Yamaguchi K, Fukumoto T, Chiba T, Nishikawa SI. Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. J Exp Med. 2001 193:621-30.

Hacker C, Kirsch RD, Ju XS, Hieronymus T, Gust TC, Kuhl C, Jorgas T, Kurz SM, Rose-John S, Yokota Y, Zenke M. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. Nat Immunol. 2003 4:380-6.

Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. Immunology. 2005 115:1-20.

Hohmann HP, Remy R, Pöschl B, van Loon AP. Tumor necrosis factors-alpha and-beta bind to the same two types of tumor necrosis factor receptors and maximally activate the transcription factor NF-kappa B at low receptor occupancy and within minutes after receptor binding. J Biol Chem. 1990 265:15183-8.

Homminga I, Pieters R, Langerak AW, de Rooi JJ, Stubbs A, Verstegen M, Vuerhard M, Buijs-Gladdines J, Kooi C, Klous P, van Vlierberghe P, Ferrando AA, Cayuela JM, Verhaaf B, Beverloo HB, Horstmann M, de Haas V, Wiekmeijer AS, Pike-Overzet K, Staal FJ, de Laat W, Soulier J, Sigaux F, Meijerink JP. Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell. 2011 19:484-97.

Homminga I, Pieters R, Meijerink JP. NKL homeobox genes in leukemia. Leukemia. 2012 26:572-81.

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:E2162-71.

Humphrey JH, Grennan D, Sundaram V. The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism of trapping of immune complexes on them. Eur J Immunol. 1984 14:859-64.

Ishikawa H. Differentiation of red pulp and evaluation of hemopoietic role of human prenatal spleen. Arch Histol Jpn. 1985 48:183-97

Ito R, Kita M, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Iwakura Y, Okanoue T, Yoshikawa T, Kataoka K, Mazda O. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2008 377:12-6.

Ito S, Naito M, Kobayashi Y, Takatsuka H, Jiang S, Usuda H, Umezu H, Hasegawa G, Arakawa M, Shultz LD, Elomaa O, Tryggvason K. Roles of a macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) in host defense and heterogeneity of splenic marginal zone macrophages. Arch Histol Cytol. 1999 62:83-95.

Ivanov II, Diehl GE, Littman DR. Lymphoid Tissue Inducer Cells in Intestinal Immunity. Curr Top Microbiol Immunol. 2006 308:59-82.

Jarjour M, Jorquera A, Mondor I, Wienert S, Narang P, Coles MC, Klauschen F, Bajénoff M. Fate mapping reveals origin and dynamics of lymph node follicular dendritic cells. J Exp Med. 2014 2111109-22.

Jia X, Gábris F, Jacobsen O, 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.

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. Proc Natl Acad Sci U S A.1995 92:3566-70.

Kanamori Y, Ishimaru K, Nanno M, Maki K, Ikuta K, Nariuchi H, Ishikawa H. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thy1+ lympho-hemopoietic progenitors develop. J Exp Med. 1996 184:1449-59.

Kang YS, Do Y, Lee HK, Park SH, Cheong C, Lynch RM, Loeffler JM, Steinman RM, Park CG. A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. Cell. 2006 125:47-58.

Kapasi ZF, Burton GF, Shultz LD, Tew JG, Szakal AK. Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. J Immunol. 1993 150:2648-58.

Karlsson MC, Guinamard R, Bolland S, Sankala M, Steinman RM, Ravetch JV. Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. J Exp Med. 2003 198:333-40.

Katakai T, Suto H, Sugai M, Gonda H, Togawa A, Suematsu S, Ebisuno Y, Katagiri K, Kinashi T, Shimizu A. Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. J Immunol. 2008 181:6189-200.

Kellermayer Z, Lábadi A, Czömpöly 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.

Kellermayer Z, Mihalj M, Labadi A, Czompoly T, Lee M., O'Hara E, Butcher EC, Berta G, Balogh A, Arnold HH, Balogh P. 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.

Kellermayer Z, Fisi V, Mihalj M, Berta G, Kóbor J, Balogh P. Marginal Zone Macrophage Receptor MARCO Is Trapped in Conduits Formed by Follicular Dendritic Cells in the Spleen. J Histochem Cytochem. 2014 62:436-449.

Kellermayer Z, Hayasaka H, Kajtár B, Simon D, Robles EF, Martinez-Climent JA, Balogh P. Divergence of Vascular Specification in Visceral Lymphoid Organs-Genetic Determinants and Differentiation Checkpoints. Int Rev Immunol. 2016 35:489-502.

Kellermayer Z, Vojkovics D, Dakah TA, Bodó K, Botz B, Helyes Z, Berta G, Kajtár B, Schippers A, Wagner N, Scotto L, O'Connor OA, Arnold HH, Balogh P. IL-22-Independent Protection from Colitis in the Absence of Nkx2.3 Transcription Factor in Mice. J Immunol. 2019 202:1833-1844.

Kelly KA, Scollay R. Seeding of neonatal lymph nodes by T cells and identification of a novel population of CD3-CD4+ cells. Eur J Immunol. 1992 22:329-34.

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell. 2005 121:1109-21.

Kim BM, Miletich I, Mao J, McMahon AP, Sharpe PA, Shivdasani RA. Independent functions and mechanisms for homeobox gene Barx1 in patterning mouse stomach and spleen. Development. 2007 134:3603-13.

Kim D, Mebius RE, MacMicking JD, Jung S, Cupedo T, Castellanos Y, Rho J, Wong BR, Josien R, Kim N, Rennert PD, Choi Y. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. J Exp Med. 2000 192:1467-78.

Kim SK, Hebrok M, Li E, Oh SP, Schrewe H, Harmon EB, Lee JS, Melton DA. Activin receptor patterning of foregut organogenesis. Genes Dev. 2000 14:1866-71.

Kiss EA, Vonarbourg C, Kopfmann S, Hobeika E, Finke D, Esser C, Diefenbach A. Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. Science. 2011 334:1561-5.

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.

Koehler K, Franz T, Dear TN. Hox11 is required to maintain normal Wt1 mRNA levels in the developing spleen. Dev Dyn. 2000 218:201-6.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL,Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature. 1999 397:315-23.

Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, Flavell RA. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. Immunity. 1997 6:491-500.

Koss M, Bolze A, Brendolan A, Saggese M, Capellini TD, Bojilova E, Boisson B, Prall OW, Elliott DA, Solloway M, Lenti E, Hidaka C, Chang CP, Mahlaoui N, Harvey RP, Casanova JL, Selleri L. Congenital asplenia in mice and humans with mutations in a Pbx/Nkx2-5/p15 module. Dev Cell. 2012 22:913-26.

Kraal G, Schornagel K, Streeter PR, Holzmann B, Butcher EC. Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen. Am J Pathol. 1995 147:763-71.

Kraal G, van der Laan LJ, Elomaa O, Tryggvason K. The macrophage receptor MARCO. Microbes Infect. 2000 2:313-6.

Kraal G, Mebius R. New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. Int Rev Cytol. 2006 250:175-215.

Kranich J, Krautler NJ, Heinen E, Polymenidou M, Bridel C, Schildknecht A, Huber C, Kosco-Vilbois MH, Zinkernagel R, Miele G, Aguzzi A. Follicular dendritic cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8. J Exp Med. 2008 205:1293-302.

Krautler NJ, Kana V, Kranich J, Tian Y, Perera D, Lemm D, Schwarz P, Armulik A, Browning JL, Tallquist M, Buch T, Oliveira-Martins JB, Zhu C, Hermann M, Wagner U, Brink R, Heikenwalder M, Aguzzi A. Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. Cell. 2012 150:194-206.

Krishan K, McKinnell I, Patel K, Dhoot GK. Dynamic Id2 expression in the medial and lateral domains of avian dermamyotome. Dev Dyn. 2005 234:363-70.

Kuprash DV, Alimzhanov MB, Tumanov AV, Grivennikov SI, Shakhov AN, Drutskaya LN, Marino MW, Turetskaya RL, Anderson AO, Rajewsky K, Pfeffer K, Nedospasov SA. Redundancy in tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) signaling in vivo: mice with inactivation of the entire TNF/LT locus versus single-knockout mice. Mol Cell Biol. 2002 22:8626-34

Kvell K, Czömpöly T, Pikkarainen T, Balogh P. Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 2006 341:1193-202.

Kvell K, Czömpöly T, Hiripi L, Balogh P, Kóbor J, Bodrogi L, Pongrácz JE, Ritchie WA, Bosze Z. Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis. Transgenic Res. 2010 19:105-12.

Lábadi A, Balogh P. Differential preferences in serosal homing and distribution of peritoneal B-cell subsets revealed by in situ CFSE labeling. Int Immunol. 2009 21:1047-56.

Lampisuo M, Liippo J, Vainio O, McNagny KM, Kulmala J, Lassila O. Characterization of prethymic progenitors within the chicken embryo. Int Immunol. 1999 11:63-9.

Lee M, Kiefel H, LaJevic MD, Macauley MS, Kawashima H, O'Hara E, Pan J, Paulson JC, Butcher EC. Transcriptional programs of lymphoid tissue capillary and high endothelium reveal control mechanisms for lymphocyte homing. Nat Immunol. 2014 15:982-95.

Lenti E, Farinello D, Yokoyama KK, Penkov D, Castagnaro L, Lavorgna G, Wuputra K, Sandell LL, Tjaden NE, Bernassola F, Caridi N, De Antoni A, Wagner M, Kozinc K, Niederreither K, Blasi F, Pasini D, Majdic G, Tonon G, Trainor PA, Brendolan A. Transcription factor TLX1 controls retinoic acid signaling to ensure spleen development. J Clin Invest. 2016 126:2452-64.

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 96:9695-700.

Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. J Exp Med. 2006 203:2271-9.

Lindemans CA, Calafiore M, Mertelsmann AM, O'Connor MH, Dudakov JA, Jenq RR, Velardi E, Young LF, Smith OM, Lawrence G, Ivanov JA, Fu YY, Takashima S, Hua G, Martin ML, O'Rourke KP, Lo YH, Mokry M, Romera-Hernandez M, Cupedo T, Dow L, Nieuwenhuis EE, Shroyer NF, Liu C, Kolesnick R, van den Brink MRM, Hanash AM. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. Nature. 2015 528:560-564.

Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, Luther SA. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. Nat Immunol. 2007 8:1255-65.

Lochner M, Ohnmacht C, Presley L, Bruhns P, Si-Tahar M, Sawa S, Eberl G. Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of RORgamma t and LTi cells. J Exp Med. 2011 208:125-34.

Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, Lamers MC, Carsetti R. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. J Exp Med. 1999 190:75-89.

Lokmic Z, Lämmermann T, Sixt M, Cardell S, Hallmann R, Sorokin L. The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. Semin Immunol. 2008 20:4-13.

Lu J, Chang P, Richardson JA, Gan L, Weiler H, Olson EN. The basic helix-loop-helix transcription factor capsulin controls spleen organogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 97:9525-30.

Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG. 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. 2000 97:12694-9.

Luther SA, Ansel KM, Cyster JG. Overlapping roles of CXCL13, interleukin 7 receptor alpha, and CCR7 ligands in lymph node development. J Exp Med. 2003 197:1191-8.

Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeobox gene Nkx2-5. Genes Dev. 1995 9:1654-66.

Mackay F, Majeau GR, Lawton P, Hochman PS, Browning JL. Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice. Eur J Immunol. 1997 27:2033-42.

Mackay F, Browning JL. Turning off follicular dendritic cells. Nature. 1998 395:26-7.

Majumder S, Amatya N, Revu S, Jawale CV, Wu D, Rittenhouse N, Menk A, Kupul S, Du F, Raphael I, Bhattacharjee A, Siebenlist U, Hand TW, Delgoffe GM, Poholek AC, Gaffen SL, Biswas PS, McGeachy MJ. IL-17 metabolically reprograms activated fibroblastic reticular cells for proliferation and survival. Nat Immunol. 2019 20:534-545.

Malhotra D, Fletcher AL, Turley SJ. Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. Immunol Rev. 2013 251:160-76.

Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. Nat Rev Immunol. 2002 2:323-35.

Martinez-Pomares L, Gordon S. CD169+ macrophages at the crossroads of antigen presentation. Trends Immunol. 2012 33:66-70.

Matsumoto M, Mariathasan S, Nahm MH, Baranyay F, Peschon JJ, Chaplin DD. Role of lymphotoxin and the type I TNF receptor in the formation of germinal centers. Science. 1996 271:1289-91.

Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, Kochel KD, Cheung TC, Yu GL, Ruben S, Murphy M, Eisenberg RJ, Cohen GH, Spear PG, Ware CF. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. Immunity. 1998 8:21-30.

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 176:2367-77.

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 93:11019-24.

Mebius RE, Rennert P, Weissman IL. Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. Immunity. 1997 7:493-504.

Mebius RE, Miyamoto T, Christensen J, Domen J, Cupedo T, Weissman IL, Akashi K. The fetal liver counterpart of adult common lymphoid progenitors gives rise to all lymphoid lineages, CD45+CD4+CD3- cells, as well as macrophages. J Immunol. 2001 166:6593-601.

Mebius RE, Organogenesis of Lymphoid Tissues, Nat Rev Immunol. 2003 3:292-303

Mebius RE, Nolte MA, Kraal G. Development and function of the splenic marginal zone. Crit Rev Immunol. 2004 24:449-64.

Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol. 2005 5:606-16.

Meier D, Bornmann C, Chappaz S, Schmutz S, Otten LA, Ceredig R, Acha-Orbea H, Finke D. Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. Immunity. 2007 26:643-54.

Michel ML, Mendes-da-Cruz D, Keller AC, Lochner M, Schneider E, Dy M, Eberl G, Leite-de-Moraes MC. Critical role of ROR-γt in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 105:19845-50.

Mionnet C, Mondor I, Jorquera A, Loosveld M, Maurizio J, Arcangeli ML, Ruddle NH, Nowak J, Aurrand-Lions M, Luche H, Bajénoff M. Identification of a new stromal cell type involved in the regulation of inflamed B cell follicles. PLoS Biol. 2013 11:e1001672.

Mitchell J. Lymphocyte circulation in the spleen. Marginal zone bridging channels and their possible role in cell traffic. Immunology. 1973 24:93-107.

Mok H, Mendoza M, Prchal JT, Balogh P, Schumacher A. Dysregulation of ferroportin 1 interferes with spleen organogenesis in polycythaemia mice. Development. 2004 131:4871-81.

Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. Nature. 2010 463:540-4.

Murray R, Suda T, Wrighton N, Lee F, Zlotnik A. IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets. Int Immunol. 1989 1:526-31.

Müller U, Jongeneel CV, Nedospasov SA, Lindahl KF, Steinmetz M. Tumour necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. Nature. 1987 325:265-7.

Müller G, Höpken UE, Lipp M. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. Immunol Rev. 2003 195:117-35.

Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, Mosley B, March CJ, Urdal D, Gillis S. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. Nature. 1988 333:571-3.

Nayar S, Campos J, Smith CG, Iannizzotto V, Gardner DH, Mourcin F, Roulois D, Turner J, Sylvestre M, Asam S, Glaysher B, Bowman SJ, Fearon DT, Filer A, Tarte K, Luther SA, Fisher BA, Buckley CD, Coles MC, Barone F. Immunofibroblasts are pivotal drivers of tertiary lymphoid structure formation and local pathology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 116:13490-13497.

Ngo VN, Cornall RJ, Cyster JG. Splenic T zone development is B cell dependent. J Exp Med. 2001 194:1649-60.

Nikolich-Žugich J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. Nat Immunol. 2018 19:10-19.

Nishikawa S, Honda K, Vieira P, Yoshida H. Organogenesis of peripheral lymphoid organs. Immunol Rev. 2003 195:72-80.

Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, Leonard WJ. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. Science. 1993 262:1877-80.

Nolte MA, Hamann A, Kraal G, Mebius RE. The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. Immunology. 2002 106:299-307.

Nolte MA, Beliën JA, Schadee-Eestermans I, Jansen W, Unger WW, van Rooijen N, Kraal G, Mebius RE. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. J Exp Med. 2003 198:505-12.

Nolte MA, Kraal G, Mebius RE. Effects of fluorescent and nonfluorescent tracing methods on lymphocyte migration in vivo. Cytometry A. 2004 61:35-44.

Nolte MA, Arens R, Kraus M, van Oers MH, Kraal G, van Lier RA, Mebius RE. B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. J Immunol. 2004 172:3620-7.

Oh SP, Li E. Gene-dosage-sensitive genetic interactions between inversus viscerum (iv), nodal, and activin type IIB receptor (ActRIIB) genes in asymmetrical patterning of the visceral organs along the left-right axis. Dev Dyn. 2002 224:279-90.

Ohl L, Henning G, Krautwald S, Lipp M, Hardtke S, Bernhardt G, Pabst O, Förster R. Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. J Exp Med. 2003 197:1199-204.

Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Förster R, Lipp M, Littman DR, Cyster JG. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. J Exp Med. 2002 196:65-75.

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.

Olivier BJ, Cailotto C, van der Vliet J, Knippenberg M, Greuter MJ, Hilbers FW, Konijn T, Te Velde AA, Nolte MA, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ, Mebius RE. Vagal innervation is required for the formation of tertiary lymphoid tissue in colitis. Eur J Immunol. 2016 46:2467-2480.

Onder L, Danuser R, Scandella E, Firner S, Chai Q, Hehlgans T, Stein JV, Ludewig B. Endothelial cell-specific lymphotoxin-β receptor signaling is critical for lymph node and high endothelial venule formation. J Exp Med. 2013 210:465-73.

Onder L, Mörbe U, Pikor N, Novkovic M, Cheng HW, Hehlgans T, Pfeffer K, Becher B, Waisman A, Rülicke T, Gommerman J, Mueller CG, Sawa S, Scandella E, Ludewig B. Lymphatic Endothelial Cells Control Initiation of Lymph Node Organogenesis. Immunity. 2017 47:80-92.

Onder L, Ludewig B. A Fresh View on Lymph Node Organogenesis. Trends Immunol. 2018 39:775-787.

Overwijk WW, Schluns KS. Functions of γC cytokines in immune homeostasis: current and potential clinical applications. Clin Immunol. 2009 132:153-65.

Ozawa T, Koyama K, Ando T, Ohnuma Y, Hatsushika K, Ohba T, Sugiyama H, Hamada Y, Ogawa H, Okumura K, Nakao A. Thymic stromal lymphopoietin secretion of synovial fibroblasts is positively and negatively regulated by Toll-like receptors/nuclear factor-kappaB pathway and interferon-gamma/dexamethasone. Mod Rheumatol. 2007 17:459-63.

Pabst O, Herbrand H, Arnold HH. Nkx2-9 is a novel homeobox transcription factor which demarcates ventral domains in the developing mouse CNS. Mech Dev. 1998 73:85-93.

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

Pabst O, Förster 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.

Park EJ, Prajuabjinda O, Soe ZY, Darkwah S, Appiah MG, Kawamoto E, Momose F, Shiku H, Shimaoka M. Exosomal regulation of lymphocyte homing to the gut. Blood Adv. 2019 3:1-11.

Park SY, Saijo K, Takahashi T, Osawa M, Arase H, Hirayama N, Miyake K, Nakauchi H, Shirasawa T, Saito T. Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. Immunity. 1995 3:771-82.

Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon L, Mathew CG. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. Nat Genet. 2007 39:830-2.

Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G. 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. 1996 184:1397-411.

Pasparakis M, Alexopoulou L, Grell M, Pfizenmaier K, Bluethmann H, Kollias G. Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 94:6319-23.

Patterson KD, Drysdale TA, Krieg PA. Embryonic origins of spleen asymmetry. Development. 2000 127:167-75.

Pedersen GK, Li X, Khoenkhoen S, Ádori M, Beutler B, Karlsson Hedestam GB. B-1a Cell Development in Splenectomized Neonatal Mice. Front Immunol. 2018 9:1738.

Pellas TC, Weiss L. Deep splenic lymphatic vessels in the mouse: a route of splenic exit for recirculating lymphocytes. Am J Anat. 1990 187:347-54.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature. 1984 312:724-9.

Perez-Shibayama C, Gil-Cruz C, Ludewig B. Fibroblastic reticular cells at the nexus of innate and adaptive immune responses. Immunol Rev. 2019 289:31-41.

Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. Cytokine Growth Factor Rev. 2003 14:185-91.

Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Lehr HA, Hirth S, Weigmann B, Wirtz S, Ouyang W, Neurath MF, Becker C. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. J Exp Med. 2009 206:1465-72.

Pokholok DK, Maroulakou IG, Kuprash DV, Alimzhanov MB, Kozlov SV, Novobrantseva TI, Turetskaya RL, Green JE, Nedospasov SA. Cloning and expression analysis of the murine lymphotoxin beta gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 92(3):674-8.

Poljak L, Carlson L, Cunningham K, Kosco-Vilbois MH, Siebenlist U. Distinct activities of p52/NF-kappa B required for proper secondary lymphoid organ microarchitecture: functions enhanced by Bcl-3. J Immunol. 1999 163:6581-8.

Poloni A, Maurizi G, Anastasi S, Mondini E, Mattiucci D, Discepoli G, Tiberi F, Mancini S, Partelli S, Maurizi A, Cinti S, Olivieri A, Leoni P. Plasticity of human dedifferentiated adipocytes toward endothelial cells. Exp Hematol. 2015 43:137-46.

Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. J Biol Chem. 2001 276:19420-30.

Price M, Lazzaro D, Pohl T, Mattei MG, Rüther U, Olivo JC, Duboule D, Di Lauro R. Regional expression of the homeobox gene Nkx-2.2 in the developing mammalian forebrain. Neuron. 1992 8:241-55.

Qi H, Kastenmüller W, Germain RN. Spatiotemporal basis of innate and adaptive immunity in secondary lymphoid tissue. Annu Rev Cell Dev Biol. 2014 30:141-67.

Qin D, Wu J, Vora KA, Ravetch JV, Szakal AK, Manser T, Tew JG. Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. J Immunol. 2000 164:6268-75.

Qiu M, Shimamura K, Sussel L, Chen S, Rubenstein JL. Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression relative to other Nkx genes during vertebrate CNS development. Mech Dev. 1998 72:77-88.

Rennert PD, Browning JL, Mebius R, Mackay F, Hochman PS. Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. J Exp Med. 1996 184:1999-2006.

Rennert PD, James D, Mackay F, Browning JL, Hochman PS. Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. Immunity. 1998 9:71-9.

Roberts CW, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Hox11 controls the genesis of the spleen. Nature. 1994 368:747-9.

Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. Nat Rev Immunol. 2009 9:480-90.

Rodda LB, Bannard O, Ludewig B, Nagasawa T, Cyster JG. Phenotypic and Morphological Properties of Germinal Center Dark Zone Cxcl12-Expressing Reticular Cells. J Immunol. 2015 195:4781-91.

Rodda LB, Lu E, Bennett ML, Sokol CL, Wang X, Luther SA, Barres BA, Luster AD, Ye CJ, Cyster JG. Single-Cell RNA Sequencing of Lymph Node Stromal Cells Reveals Niche-Associated Heterogeneity. Immunity. 2018 48:1014-1028.

Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. Annu Rev Immunol. 2004 22:129-56.

Ruddle NH, Akirav EM. Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. J Immunol. 2009 183:2205-12.

Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. J Exp Med. 1995 181:411-5.

Sánchez M, Göttgens B, Sinclair AM, Stanley M, Begley CG, Hunter S, Green AR. An SCL 3′ enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors. Development. 1999 126:3891-904.

Sandoval P, Jiménez-Heffernan JA, Rynne-Vidal Á, Pérez-Lozano ML, Gilsanz Á, Ruiz-Carpio V, Reyes R, García-Bordas J, Stamatakis K, Dotor J, Majano PL, Fresno M, Cabañas C, López-Cabrera M. Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal metastasis. J Pathol. 2013 231:517-31.

Satoh T, Sakurai E, Tada H, Masuda T. Ontogeny of reticular framework of white pulp and marginal zone in human spleen: immunohistochemical studies of fetal spleens from the 17th to 40th week of gestation. Cell Tissue Res. 2009 336:287-97.

Schaeuble K, Britschgi MR, Scarpellino L, Favre S, Xu Y, Koroleva E, Lissandrin TKA, Link A, Matloubian M, Ware CF, Nedospasov SA, Tumanov AV, Cyster JG, Luther SA. Perivascular Fibroblasts of the Developing Spleen Act as LTα1β2-Dependent Precursors of Both T and B Zone Organizer Cells. Cell Rep. 2017 21:2500-2514.

Scheu S, Alferink J, Pötzel T, Barchet W, Kalinke U, Pfeffer K. Targeted disruption of LIGHT causes defects in costimulatory T cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis. J Exp Med. 2002 195:1613-24.

Schippers A, Leuker C, Pabst O, Kochut A, Prochnow B, Gruber AD, Leung E, Krissansen GW, Wagner N, Müller W. Mucosal addressin cell-adhesion molecule-1 controls plasma-cell migration and function in the small intestine of mice. Gastroenterology. 2009 137:924-33.

Schneider A, Mijalski T, Schlange T, Dai W, Overbeek P, Arnold HH, Brand T. The homeobox gene NKX3.2 is a target of left-right signalling and is expressed on opposite sides in chick and mouse embryos. Curr Biol. 1999 9:911-4.

Schneider K, Potter KG, Ware CF. Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. Immunol Rev. 2004 202:49-66.

Schriever F, Nadler LM. The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. Adv Immunol. 1992 51:243-84.

Scotto L, Kruithof-de Julio M, Paoluzzi L, Kalac M, Marchi E, Buitrago JB, Amengual J, Shen MM, O'Connor OA. Development and characterization of a novel CD19CherryLuciferase (CD19CL) transgenic mouse for the preclinical study of B-cell lymphomas. Clin Cancer Res. 2012 18:3803-11.

Selleri L, Depew MJ, Jacobs Y, Chanda SK, Tsang KY, Cheah KS, Rubenstein JL, O'Gorman S, Cleary ML. Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. Development. 2001 128:3543-57.

Sock E, Rettig SD, Enderich J, Bösl MR, Tamm ER, Wegner M. Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling. Mol Cell Biol. 2004 24:6635-44.

Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. Annu Rev Immunol. 2012 30:647-75.

Stanfel MN, Moses KA, Schwartz RJ, Zimmer WE. Regulation of organ development by the NKX-homeodomain factors: an NKX code. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2005 Suppl 51:OL785-99.

Steiniger B, Barth P, Herbst B, Hartnell A, Crocker PR. The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone. Immunology. 1997 92:307-16.

Steiniger B, Barth P. Microanatomy and function of the spleen. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2000 151:III-IX, 1-101.

Steiniger B, Barth P, Hellinger A. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp : do fibroblasts guide lymphocyte immigration? Am J Pathol. 2001 159:501-12.

Steiniger B, Ulfig N, Risse M, Barth PJ. Fetal and early post-natal development of the human spleen: from primordial arterial B cell lobules to a non-segmented organ. Histochem Cell Biol. 2007 128:205-15.

Steiniger B, Stachniss V, Schwarzbach H, Barth PJ. Phenotypic differences between red pulp capillary and sinusoidal endothelia help localizing the open splenic circulation in humans. Histochem Cell Biol. 2007 128:391-8.

Steiniger BS. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. Immunology. 2015 145:334-46.

Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, Bargatze RF, Butcher EC. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. Nature. 1988 331:41-6.

Sun Z, Unutmaz D, Zou YR, Sunshine MJ, Pierani A, Brenner-Morton S, Mebius RE, Littman DR. Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. Science. 2000 288:2369-73.

Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, German MS. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. Development. 1998 125:2213-21.

Swystun LL, Lai JD, Notley C, Georgescu I, Paine AS, Mewburn J, Nesbitt K, Schledzewski K, Géraud C, Kzhyshkowska J, Goerdt S, Hopman W, Montgomery RR, James PD, Lillicrap D. The endothelial cell receptor stabilin-2 regulates VWF-FVIII complex half-life and immunogenicity. J Clin Invest. 2018 128:4057-4073.

Szakal AK, Taylor JK, Smith JP, Kosco MH, Burton GF, Tew JJ. Kinetics of germinal center development in lymph nodes of young and aging immune mice. Anat Rec. 1990 227:475-85.

Tadayon S, Dunkel J, Takeda A, Halle O, Karikoski M, Gerke H, Rantakari P, Virtakoivu R, Pabst O, Salmi M, Hollmén M, Jalkanen S. Clever-1 contributes to lymphocyte entry into the spleen via the red pulp. Sci Immunol. 2019 (33) doi: 10.1126/sciimmunol.aat0297.

Takatori H, Kanno Y, Watford WT, Tato CM, Weiss G, Ivanov II, Littman DR, O'Shea JJ. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. J Exp Med. 2009 206:35-41.

Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Pálinkás L, Szabó M, Berta G, Sétáló G Jr, Németh P, Berki T. Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. Int Immunol. 2009 21:1269-76.

Tanaka H, Hataba Y, Saito S, Fukushima O, Miyasaka M. Phenotypic characteristics and significance of reticular meshwork surrounding splenic white pulp of mice. J Electron Microsc (Tokyo). 1996 45:407-16.

Tarlinton D, Light A, Metcalf D, Harvey RP, Robb L. Architectural defects in the spleens of Nkx2-3-deficient mice are intrinsic and associated with defects in both B cell maturation and T cell-dependent immune responses. J Immunol. 2003 170:4002-10.

Taylor BC, Zaph C, Troy AE, Du Y, Guild KJ, Comeau MR, Artis D. TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. J Exp Med. 2009 206:655-67.

Taylor PR, Pickering MC, Kosco-Vilbois MH, Walport MJ, Botto M, Gordon S, Martinez-Pomares L. The follicular dendritic cell restricted epitope, FDC-M2, is complement C4; localization of immune complexes in mouse tissues. Eur J Immunol. 2002 32:1888-96.

Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. Trends Immunol. 2005 26:104-10.

Tew JG, Kosco MH, Burton GF, Szakal AK. Follicular dendritic cells as accessory cells. Immunol Rev. 1990 117:185-211.

Thompson HL, Smithey MJ, Surh CD, Nikolich-Žugich J. Functional and Homeostatic Impact of Age-Related Changes in Lymph Node Stroma. Front Immunol. 2017 Jun 14;8:706. doi: 10.3389/fimmu.

Tierens A, Delabie J, Michiels L, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C. Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion. Blood. 1999 93:226-34.

Tumanov AV, Grivennikov SI, Shakhov AN, Rybtsov SA, Koroleva EP, Takeda J, Nedospasov SA, Kuprash DV. Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting. Immunol Rev. 2003 195:106-16

Van den Berg TK, Yoshida K, Dijkstra CD. Mechanism of immune complex trapping by follicular dendritic cells. Curr Top Microbiol Immunol. 1995 201:49-67.

Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AW. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. Gastroenterology. 2006 131:117-29.

van Rooijen N, van Nieuwmegen R. Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. Cell Tissue Res. 1984 238:355-8.

Van Vliet E, Melis M, Foidart JM, Van Ewijk W. Reticular fibroblasts in peripheral lymphoid organs identified by a monoclonal antibody. J Histochem Cytochem. 1986 34:883-90.

Vellguth S, von Gaudecker B, Müller-Hermelink HK. The development of the human spleen. Ultrastructural studies in fetuses from the 14th to 24th week of gestation. Cell Tissue Res. 1985 242:579-92.

Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie ANJ, Mebius RE, Powrie F, Spits H. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. Cell. 2018 174:1054-1066.

Vojkovics D, Kellermayer Z, Heidt D, Mihalj M, Kajtár B, Ernszt D, Kovács T, Németh P, Balogh P. 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 22:421-30.

Vojkovics D, Kellermayer Z, Kajtár B, Roncador G, Vincze Á, Balogh P. Nkx2-3-A Slippery Slope From Development Through Inflammation Toward Hematopoietic Malignancies. Biomark Insights. 2018 13:1177271918757480.

Vondenhoff MF, Desanti GE, Cupedo T, Bertrand JY, Cumano A, Kraal G, Mebius RE, Golub R. Separation of splenic red and white pulp occurs before birth in a LTalphabeta-independent manner. J Leukoc Biol. 2008 84:152-61.

Vondenhoff MF, Greuter M, Goverse G, Elewaut D, Dewint P, Ware CF, Hoorweg K, Kraal G, Mebius RE. LTbetaR signaling induces cytokine expression and up-regulates lymphangiogenic factors in lymph node anlagen. J Immunol. 2009 182:5439-45.

Vondenhoff MF, van de Pavert SA, Dillard ME, Greuter M, Goverse G, Oliver G, Mebius RE. Lymph sacs are not required for the initiation of lymph node formation. Development. 2009 136:29-34.

von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. J Exp Med. 1995 181:1519-26.

Vosshenrich CA, Cumano A, Müller W, Di Santo JP, Vieira P. Thymic stromal-derived lymphopoietin distinguishes fetal from adult B cell development. Nat Immunol. 2003 4:773-9.

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.

Wang CC, Biben C, Robb L, Nassir F, Barnett L, Davidson NO, Koentgen F, Tarlinton D, Harvey RP. 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.

Wang J, Foster A, Chin R, Yu P, Sun Y, Wang Y, Pfeffer K, Fu YX. The complementation of lymphotoxin deficiency with LIGHT, a newly discovered TNF family member, for the restoration of secondary lymphoid structure and function. Eur J Immunol. 2002 32:1969-79.

Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, Georgopoulos K. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. Immunity. 1996 5:537-49.

Wang SL, Kutsche M, DiSciullo G, Schachner M, Bogen SA. Selective malformation of the splenic white pulp border in L1-deficient mice. J Immunol. 2000 165:2465-73.

Wardemann H, Boehm T, Dear N, Carsetti R. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. J Exp Med. 2002 195:771-80.

Ware CF, Crowe PD, Grayson MH, Androlewicz MJ, Browning JL. Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. J Immunol. 1992 149:3881-8.

Ware CF, VanArsdale TL, Crowe PD, Browning JL. The ligands and receptors of the lymphotoxin system. Curr Top Microbiol Immunol. 1995 198:175-218.

Ware CF. The TNF Superfamily-2008. Cytokine Growth Factor Rev. 2008 19:183-6.

Warnock RA, Campbell JJ, Dorf ME, Matsuzawa A, McEvoy LM, Butcher EC. The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. J Exp Med. 2000 191:77-88.

Weih DS, Yilmaz ZB, Weih F. Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. J Immunol. 2001 167:1909-19.

Weih F, Caamaño J. Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. Immunol Rev. 2003 195:91-105.

Wen L, Shinton SA, Hardy RR, Hayakawa K. Association of B-1 B cells with follicular dendritic cells in spleen. J Immunol. 2005 174:6918-26.

White AJ, Nakamura K, Jenkinson WE, Saini M, Sinclair C, Seddon B, Narendran P, Pfeffer K, Nitta T, Takahama Y, Caamano JH, Lane PJ, Jenkinson EJ, Anderson G. Lymphotoxin signals from positively selected thymocytes regulate the terminal differentiation of medullary thymic epithelial cells. J Immunol. 2010 185:4769-76.

Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. Cell. 1999 98:769-78.

Williams-Abbott L, Walter BN, Cheung TC, Goh CR, Porter AG, Ware CF. The lymphotoxin-alpha (LTalpha) subunit is essential for the assembly, but not for the receptor specificity, of the membrane-anchored LTalpha1beta2 heterotrimeric ligand. J Biol Chem. 1997 272:19451-6.

Withers DR, Kim MY, Bekiaris V, Rossi SW, Jenkinson WE, Gaspal F, McConnell F, Caamano JH, Anderson G, Lane PJ. The role of lymphoid tissue inducer cells in splenic white pulp development. Eur J Immunol. 2007 37:3240-5.

Yokota Y, Mansouri A, Mori S, Sugawara S, Adachi S, Nishikawa S, Gruss P. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. Nature. 1999 397:702-6.

Yoshida H, Honda K, Shinkura R, Adachi S, Nishikawa S, Maki K, Ikuta K, Nishikawa SI. IL-7 receptor alpha+ CD3(-) cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches. Int Immunol. 1999 11:643-55.

Yoshida H, Naito A, Inoue J, Satoh M, Santee-Cooper SM, Ware CF, Togawa A, Nishikawa S, Nishikawa S. Different cytokines induce surface lymphotoxin-alphabeta on IL-7 receptor-alpha cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches. Immunity. 2002 17:823-33.

Yu W, Hegarty JP, Berg A, Chen X, West G, Kelly AA, Wang Y, Poritz LS, Koltun WA, Lin Z. NKX2-3 transcriptional regulation of endothelin-1 and VEGF signaling in human intestinal microvascular endothelial cells. PLoS One. 2011 6:e20454.

Yu W, Hegarty JP, Berg A, Kelly AA, Wang Y, Poritz LS, Franke A, Schreiber S, Koltun WA, Lin Z. PTPN2 is associated with Crohn's disease and its expression is regulated by NKX2-3. Dis Markers. 2012 32:83-91.

Zachrau B, Finke D, Kropf K, Gosink HJ, Kirchner H, Goerg S. Antigen localization within the splenic marginal zone restores humoral immune response and IgG class switch in complement C4-deficient mice. Int Immunol. 2004 16:1685-90.

Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ, Ouyang W. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. Nat Med. 2008 14:282-9.

Zindl CL, Kim TH, Zeng M, Archambault AS, Grayson MH, Choi K, Schreiber RD, Chaplin DD. The lymphotoxin LTalpha(1)beta(2) controls postnatal and adult spleen marginal sinus vascular structure and function. Immunity. 2009 30:408-20.

dc_1678_19

12. MELLÉKLETEK

Az értekezés alapját képező közlemények

dc_1678_19

dc_1678_19

Volume 52(10): 1287–1298, 2004
Journal of Histochemistry & Cytochemistry
http://www.jhc.org

ARTICLE

Immunoarchitecture of Distinct Reticular Fibroblastic Domains in the White Pulp of Mouse Spleen

Péter Balogh, Gábor Horváth, and Andras K. Szakal

Departments of Immunology and Biotechnology (PB) and Radiotherapy and Oncology (GH), Faculty of Medicine, University of Pécs, Hungary, and Immunology Group (AKS), Department of Anatomy and Neurobiology, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia

SUMMARY The development of peripheral lymphoid tissues requires a series of cognate interactions between hemopoietic and stromal cell populations, including reticular fibroblasts, which form the mesenchymal scaffolding of distinct tissue compartments. Here we describe the formation of different fibroblastic domains in the mouse spleen white pulp by using two new rat monoclonal antibodies (MAbs). In the white pulp, MAb IBL-10 labels both T- and B-cell zone reticular elements at various intensities. The IBL-10^{hi} subset was found primarily at the edge between the peripheral part of the PALS and follicles, and the IBL-10^{lo} compartment was distributed evenly within the white pulp. The IBL-10^{hi} subset appeared during the first 2 postnatal weeks and was absent in SCID mice. The white pulp fibroblast subset identified with MAb IBL-11 had a different tissue distribution and kinetics of ontogeny, with an appearance overwhelmingly restricted to the PALS and a narrow rim at the edge of the follicular border area toward the marginal zone. The appearance of IBL-11–positive reticular cells was delayed compared with that of the IBL-10^{lo}–positive subset. The formation was independent of the influence of antigen receptor–bearing lymphocytes, as evidenced by the presence of IBL-11–positive fibroblasts in SCID mice. By transferring various lymphocyte subsets into SCID mice, partial compartmentalization of the white pulp fibroblasts could be induced, indicating that these mesenchymal fibroblast precursors retain their ability to differentiate upon encountering mature T- or B-cells.

(J Histochem Cytochem 52:1287–1298, 2004)

KEY WORDS
spleen
white pulp
stroma
fibroblast
heterogeneity
SCID mouse

A GENERAL FEATURE of the secondary lymphoid organs is their highly compartmentalized tissue structure, which correlates with their ability to mount effective immune responses. The ordered arrangement of their lymphohemopoietic and mesenchymal constituents is the result of successive cognate interactions between immature lymphoid cells and stromal precursors during tissue development, mediated by adhesion molecules, various members of the LT/TNF family and their receptors, and lymphotropic chemokines, respectively (Fu and Chaplin, 1999; Mebius 2003). These pathways must remain continuously functional both to maintain the compartmentalized structure of peripheral lymphoid tissues and to permit their eventual transformation during immune responses, including the generation of germinal centers (Mackay et al. 1997).

The spleen, as the single largest peripheral lymphoid organ in both humans and rodents, has a number of distinguishing features compared with other tissues of the immune system. The main parts of the spleen are the white pulp and the red pulp, with distinct and complementary functions. The boundary between the two regions is the marginal zone, containing specialized marginal sinus-lining cells surrounded by a fibroblastic reticular network, marginal zone macrophage subsets, and a separate B-cell pool (Kraal 1992; Martin and Kearney 2002; Karlsson et al. 2003). In the white pulp, the lymphocyte composition of distinct T- and B-cell–rich compartments is similar to that in lymph nodes (Nolte et al. 2000). In the white pulp, the T-cells encircle the central arteriole, thus

Correspondence to: Péter Balogh, Dept. of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Szigeti út 12, 7643 Pécs, Hungary. E-mail: peter.balogh@aok.pte.hu

Received for publication March 27, 2004; accepted May 25, 2004 [DOI: 10.1369/jhc.4A6328.2004].

© The Histochemical Society, Inc.
0022-1554/04/$3.30

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry

dc_1678_19

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry

forming the periarteriolar lymphoid sheath (PALS), to which spheroid accumulations of B-cells and follicular dendritic cells as follicles are connected. The red pulp may serve as an auxillary myelopoietic compartment and functions as an exit route for the majority of recirculating lymphoid cells. In addition, it efficiently phagocytoses blood-borne antigens and decaying erythrocytes via its macrophages, and hosts clusters of plasma cells (MacLennan et al. 2003).

The movement of recirculating lymphoid cells and the flow of soluble compounds are greatly influenced by the mesenchymal scaffolding of the spleen, composed of reticular cells and a broad array of extracellular matrix components associated with these cells (Liakka and Autio-Harmainen 1992; Ocklind et al. 1993). This guiding function may also include the adsorption and selective display of homing chemokines produced by regional (follicular or T-cell zone–associated) stromal cells as directional cues (Nolte et al. 2003). In this complex arrangement, the fibroblastic reticular cells create a meshwork that may connect distant parts of the splenic lymphoid tissue and may thus contribute to the formation of a continuous route for migrating cells and soluble molecules as well, similarly to lymph nodes (Gretz et al. 1996). Furthermore, the possible role of reticular cells in influencing specific immune responses has been indicated by the trapping and possible retention of immune complexes coated via complement by ill-defined perivascular reticular cells (Taylor et al. 2002). Moreover, the addition of fibroblast cells in culture could promote the formation of plasma cells after in vitro activation of human B-cells, in which system the extent of this supportive effect was dependent on the tissue origin of fibroblastic cells (Skibinski et al. 1998).

Although many of the molecular mechanisms that contribute to the lymphocyte migration and positioning remain obscure, many aspects of the splenic fibroblastic reticular cells have remained enigmatic. A limited number of studies indicate their regional heterogeneity with regard to their phenotypic markers (Yoshida et al. 1991,1993). However, data concerning their developmental and functional specifics are sparse (ten Dam et al. 2003). In murine studies aimed at the splenic reticular architecture, the fibroblasts have been identified with the rat monoclonal antibody ER-TR7 (Van Vliet et al. 1986) against an undefined marker that, although providing valuable information on the general fibroblastic arrangement of the spleen and other lymphoid organs, does not reveal the regional complexity of the reticular meshwork. Therefore, any new reagent that can identify subset-restricted elements of the reticular fibroblastic compartments may be of potential use in providing more accurate data on the dynamics and architecture of the lymphoid-mesenchymal domains of the spleen.

Here we report the production of two new rat monoclonal antibodies (MAbs) directed against different elements of the splenic fibroblast network. Using these antibodies, we also analyze the postnatal appearance of distinct fibroblast subsets and their spatial relationship in both normal and SCID mice, and also in chimeric SCID mice reconstituted with mature lymphoid cells. Our data indicate that the reticular scaffolding in various parts of the splenic white pulp is composed of phenotypically different fibroblasts whose physiological tissue arrangement in normal mice requires the presence of lymphocytes.

Materials and Methods

Mice

Inbred BALB/c (H-2^d), C.B-17/Icr scid/scid (SCID, H-2^d), and C57Bl/6 (B6, H-2^b) mice were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA) and maintained at the University's SPF animal housing facility. (BALB/c × B6) F1 (H-$2^{d/b}$) mice were used as lymphocyte donors for SCID reconstitution experiments. SCID mice 4–6 weeks old were injected IV via the lateral tail vein with 2×10^6 cells from F1 mice (either mixed or purified T- or B-cells, respectively). After reconstitution, the SCID mice were provided with Ciprobay in their drinking water. For experiments on irradiation effects, 4–6-week-old BALB/c mice were irradiated using a single open field with 6 MeV photons of a Philips Sli linear accelerator at 10 Gy calculated at midline level of the mice; source–skin distance was 100 cm. For dose buildup compensation, an 18-mm bolus was used. Dose rate was at low setting. 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.

Hybridoma Production

Splenic white pulp fragments from BALB/c mice that had been immunized IP with washed splenic red blood cells (SRBCs) were collected as described previously (Nolte et al. 2000). After isolation, the loose cells were separated from the fragments with repeated sedimentation at $1 \times g$ in DMEM tissue culture medium, followed by injection into 8-week-old Wistar rats (white pulp material equivalent to five spleens on three occasions, 2 weeks apart each). The spleen cells from immunized Wistar rats were fused with Sp-2/0 Ag 14 myeloma-derived cells using polyethylene glycol MW 4000 and processed as previously described (Köhler and Milstein 1975). The hybridoma supernatants were tested for specific antibody production using immunohistochemistry (Balázs et al. 1999); the positive wells were cloned by repeated limiting dilution.

Antibodies and Other Reagents

Anti-endothelium and pan-reticular rat MAb IBL-7/22, DaB1 mouse alloantibody (IgG_1 isotype) against MHC Class I (H-$2K^b$ allotype), FITC-labeled rat anti-mouse CD45 (clone IBL-5/25), and anti-mouse MHC Class II (IBL-5/22) MAbs

dc_1678_19

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry

were produced in our lab (Balázs et al. 1998,1999, 2001). Antibodies against murine MadCAM-1 (clone MECA-89), VCAM-1 (clone 429), CR1/2: CD35/21 (clone 7G6), and B220/CD45RA (clone RA3-6B2) were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA). The anti-mouse CD3 MAb clone KT3 was obtained from Serotec (Crawley Down, UK). For detection of unlabeled primary antibodies, PE-conjugated rat anti-mouse IgG_1, PE-conjugated goat anti-rat IgG (BD Pharmingen), or FITC-labeled mouse anti-rat IgG (Zymed; South San Francisco, CA), or biotinylated mouse monoclonal anti-rat κ-chain (clone MRK-1; BD Pharmingen) antibodies were used, in conjunction with streptavidin-PE (BD Pharmingen) or extravidin-alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich; Budapest, Hungary). The immunohistochemical (IHC) detection of fluorescein-labeled anti-B220 (BD Pharmingen) was performed using HRP-conjugated sheep anti-fluorescein IgG Fab (Roche; Mannheim, Germany).

Purification of T- and B-cells by MACS

Spleen cells (4×10^7) from (BALB/c × B6) F1 mice were divided into two aliquots and incubated with FITC-conjugated anti-B220 MAb or anti-MHC class II MAb on ice. After washing, the cells were incubated with anti-FITC beads (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany), followed by separation using VarioMACS equipment. For B-cell enrichment, the B220-positive cells were collected using an LS column; for T-cell purification, the MHC class II–positive cells were depleted with an LD column. After washing, 5×10^6 donor cells (B-, T-, and mixed) were injected IV into three different groups of SCID recipients.

Immunohistochemistry and Immunofluorescence

The single-label IHC staining of cryostat sections from various tissues with rat hybridoma supernatants containing IBL-10 and IBL-11 antibodies followed by biotin-amplified alkaline phosphatase detection was performed as described, using NBT/BCIP as chromogen substrate in the presence of 1 mg/ml levamisol (Balázs et al. 2001). For double, immunohistochemistry the visualization of stromal components by alkaline phosphatase–based labeling was followed by a short treatment of slides with dinitro-phenyl-hydrazine (1 mg/ml in PBS) to block endogeneous peroxidase activity. After rinsing, the slides were treated with normal rat IgG at 20 μg/ml to saturate the remaining binding sites of previously applied anti-rat Ig reagent, then incubated with FITC-conjugated anti-B220 MAb. The reaction was developed with HRP-conjugated sheep anti-FITC Fab fragments, using amino-ethyl carbasol as chromogen and 0.01% H_2O_2 as substrate in a 0.1 M Na-acetate buffer, pH 5.2.

For immunofluorescence, the sections were incubated with unlabeled primary antibodies followed by FITC-conjugated anti-rat IgG. For dual labeling, the sections were then blocked with 20% normal rat serum in PBS, followed by incubation with the second biotinylated MAb. After rinsing, the sections were incubated with streptavidin–PE conjugate and viewed under an Olympus BX61 fluorescent microscope. The acquisition of digital pictures with a CCD camera and the morphometric image analysis were performed using the analySIS software.

Flow Cytometry

The reconstituted SCID mice were decapitated, and their blood was collected in tubes containing Na-heparin. Their spleens were removed and snap frozen for IHC evaluation. The undiluted blood was incubated with a cocktail of FITC-conjugated rat MAb against CD45, CD3, or anti-B220 antibodies and DaB1 MAb against H-$2K^b$ on ice in the presence of 2.4G2 MAb (BD Pharmingen) to block FcγRII-mediated binding of immunoglobulins. After incubation, the cells were washed with PBS containing 0.1% BSA and Na-azide. The DaB1 (mouse IgG_1) alloantibody was revealed using PE-conjugated rat anti-mouse IgG_1. After the lysis of erythrocytes, the cells were analyzed with a Becton-Dickinson FACSCalibur using the CellQuest software. The fluorescence distribution was determined from 10,000 electronic events gated on forward- and side-scatter parameters.

Results

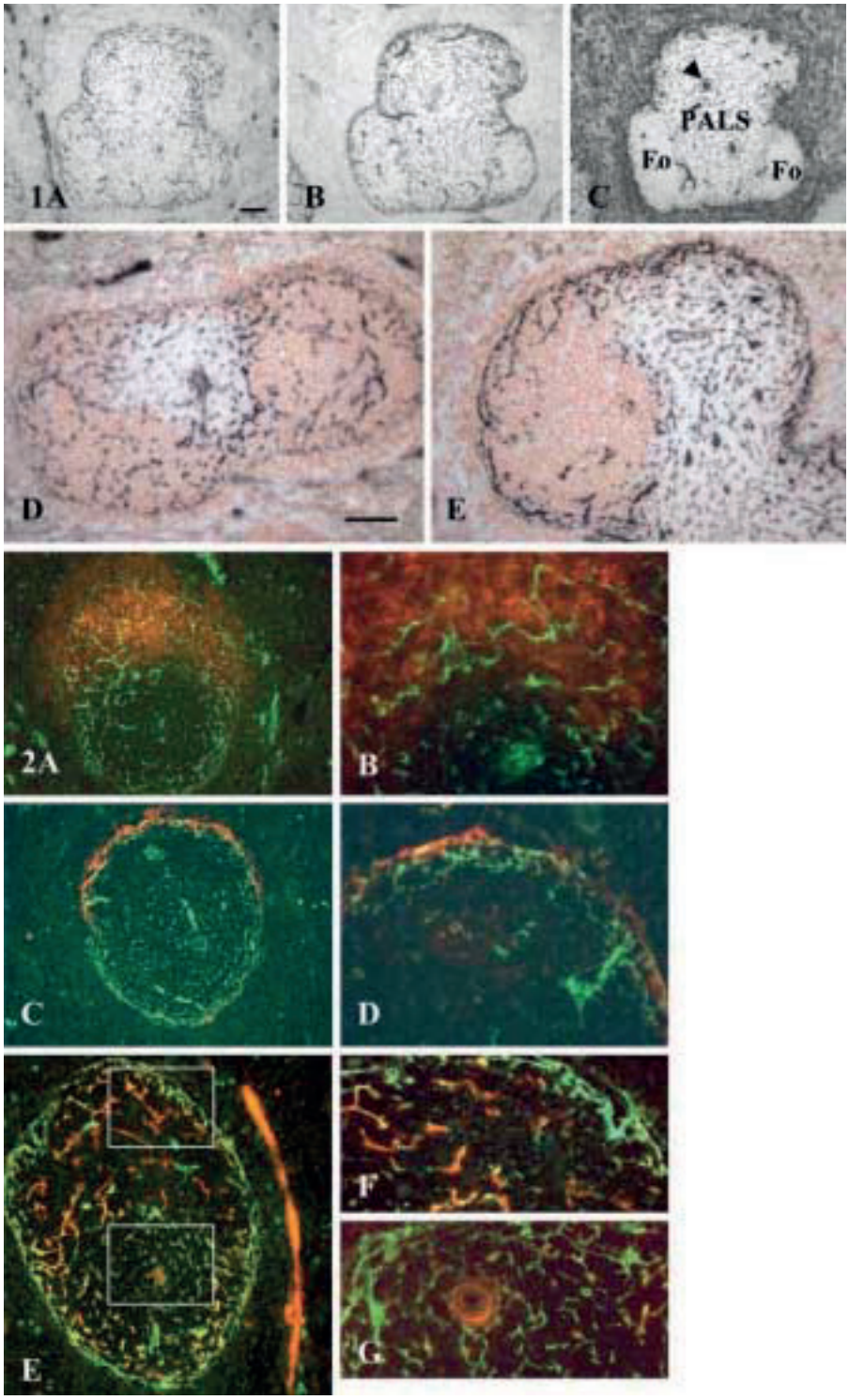
Complex Organization of White Pulp Reticular Meshwork in the Murine Spleen Delineated by Subset-specific Antibodies IBL-10 and IBL-11

The initial screening of hybridoma supernatants revealed a number of clones producing antibodies against various cellular components of both the marginal zone and central white pulp. The choice of white pulp fragments as immunogen from SRBC-primed mice proved rather effective because all of the positive clones derived from the fusion had a restricted reactivity against various components of those parts of the tissue. Because our aim was to produce antibodies capable of identifying distinct stromal elements with tissue distribution restricted to the white pulp, the clones producing antibodies with diffuse or nonselective reactivity were excluded from further studies.

With the exception of intense reaction against the trabeculae by the IBL-10 MAb, there was no specific staining of red pulp reticular components (fibers or cells) by either the IBL-10 or the IBL-11 MAb. In the white pulp, the IBL-10 antibody labeled the adventitia of central arterioles and also some reticular cells in both the follicles and the PALS. The boundary toward the marginal zone was only faintly decorated, whereas in the border region between the T and B zones, a more-pronounced reaction could often be observed. Some more intensely labeled cells could also be detected in the deeper regions of follicles (Figure 1). Induction of the germinal center by IP administration of SRBCs did not elicit the redistribution of IBL-10–reactive cells in any region of the spleen (not shown).

In addition to their mostly lymphocytic composition, the follicles also contain a number of nonlymphoid cells, including follicular dendritic cells (FDCs), whose occurrence is restricted to the follicles. The follicular appearance of strongly IBL-10–positive reticular cells prompted us to investigate their possible colocalization with FDCs using dual immunofluorescence

dc_1678_19



Figures 1 and 2

Figure 1 Splenic reactivity of IBL-10 (**A,D**) and IBL-11 (**B,E**) MAbs in serial sections from young adult mouse spleen. For comparison and tissue orientation, a pan-endothelium and reticular fibroblast staining (IBL-7/22, **C**) is shown; arrow in **C** indicates the position of central arteriole. Fo, follicles; PALS, periarteriolar lymphoid sheath. In (**B**) and (**E**), B cells are labeled red; the IBL-10 (**D**) and IBL-11 (**E**) reactive fibroblast subsets are stained gray blue/black. Bar = 100 μm.

Figure 2 Spatial relationship between various stromal elements and the fibroblast subsets identified with IBL-10 and IBL-11 MAbs. (**A,B**) Insets show IBL-10–positive fibroblasts (green) and FDCs (red anti-CR1.2) in the follicular area of the spleen. (**C,D**) Show IBL-11 fibroblasts (green) and MAdCAM-1 (red) positive marginal sinus lining cells. (**E–G**) Show the relationship between IBL-10 and IBL-11 subsets, with the two smaller insets corresponding to the approximate area from the central part of the PALS and the peripheral segment of the follicles, respectively (indicated by rectangles).

with IBL-10 MAb and an anti-CD21/35 antibody to identify FDCs. We found that apart from a few incidental juxtapositioned cells, no clear relationship could be observed between the distribution of these two cell types (Figures 2A and 2B).

Unlike the generally even distribution of IBL-10–positive reticular cells and fibers between follicles and PALS, IBL-11 MAb had a strong preference for T-cell zone reactivity (Figure 1). In addition, it also delineated an almost continuous rim within the follicles

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry

dc_1678_19

facing the white pulp proximal aspect of the marginal zone. The IBL-11–positive cells did not expand beyond the white pulp distal layer of marginal sinus, as indicated by their position relative to the sinus lining cells expressing MADCAM-1 only (Figures 2C and 2D). Similarly to IBL-10, the IBL-11 MAb had no detectable reactivity against any lymphohemopoietic cell type isolated from spleen, lymph nodes, bone marrow, and thymus (not shown).

The IHC reactions indicated that whereas the follicular and marginal zone reactivities of IBL-10 and IBL-11 MAbs were clearly different, in the PALS they may be related. To confirm this interpretation, a dual immunofluorescent staining was performed. We found that the inner PALS that surrounds the central artery containing IBL-10–positive adventitial cells appears to be dominated by IBL-11 single positive cells, while the outer PALS contains an IBL-10/11–coexpressing compartment. In the follicles, the IBL-10–positive cells seldom coexpress IBL-11, whose population is restricted to the cells adjacent to the marginal zone (Figures 2E and 2G).

Postnatal Development of the White Pulp Reticular Compartments Associated with Lymphocyte Colonization

Previous findings on the postnatal phase of spleen development have suggested the sequential reorganization of several stromal elements (including endothelial cells and FDC precursors) coupled with lymphocyte compartmentalization during the first 2 weeks after birth (Balázs et al. 2001; Balogh et al. 2001). We tested whether the fibroblastic cells identifiable with IBL-10 and IBL-11 MAbs also change their tissue distribution during the establishment of adult-type architecture.

Immediately after birth (age <D1) there were only IBL-10–positive reticular cells adjacent to the central artery, which at that stage was surrounded primarily by B-cells (identified as B220-positive lymphocytes). IBL-11 reactivity at this period could not be detected. A few days later (D3–5), a more-pronounced reactivity projecting toward the peripheral parts of the developing white pulp could be noted. By D7, a faint IBL-11 staining was observed, primarily located at the white pulp region distal to the central artery. At this stage, some focal accumulations of the B-cells could be noted, whereas the original ring-like cluster of B220-positive cells was dislodged from the immediate vicinity of the central artery by the gradual accumulation of T-cells. The border region between the T-cell–rich area and these premature follicles was sometimes found to contain the IBL-10^{hi} reticular cells mentioned previously. At ~D10, the IBL-11–positive fibroblasts showed a tendency for follicular paucity in appearance, which was accompanied by the formation of a loose rim composed of IBL-11–positive cells at the inner aspect of the MAdCAM-1–positive marginal sinus, similar to the adult-type distribution (Figure 3). The above sequence of events is summarized in Table 1.

Influence of Lymphocytes on the Establishment of Fibroblast Domains

It has been well established that the lymphoid cells play a major role in the functional diversification and compartmentalization of radiation-resistant stromal constituents during the formation of secondary lymphoid tissues (Fu and Chaplin 1999; Mebius 2003). Therefore, we investigated whether the reticular cells identified with IBL-10 and IBL-11 MAbs are also radiation resistant. We found that exposure to the supralethal dose of 10 Gy did not eliminate these cells. However, the removal of sensitive lymphoid cells induced the collapse of established networks and led to the bundling of both IBL-10 and IBL-11 elements (Figures 4A and 4B; for comparison with normal age-matched control, see Figure 1).

Because these mice had already established their fibroblastic domains before the irradiation, we next tested for the effect of absence of antigen receptor–bearing lymphocytes on the appearance of IBL-10- and IBL-11–positive components in SCID mice. It has previously been observed that the adoptive transfer of mature lymphoid cells into SCID recipients can induce the local differentiation of FDCs (Kapasi et al. 1993; Yoshida et al. 1995). We found that in control SCID mice, there was only a faint staining of fibroblasts recognized by IBL-10 MAb around the central artery. The IBL-10^{hi} compartment typically present at the border area between the follicles and PALS could not be observed. However, the red pulp trabecular staining with IBL-10 was preserved, as in normal mice. In contrast, IBL-11 MAb identified some strongly reactive cells grouped in a tight cluster at the periphery of the rudimentary white pulp area (Figures 4C and 4D). This indicated that the appearance of IBL-10^{hi} follicular fibroblasts requires the presence of mature lymphocytes. In contrast, the formation of the IBL-11–positive subset is independent of both T- and B-cells, even though its tissue arrangement is influenced by the lymphocyte compartments.

Next, we compared the ability of lymphocytes (either whole or purified T- and B-cells) to induce the rearrangement of fibroblast subsets reactive with IBL-10 and IBL-11 MAbs. The efficiency of cell transfer was evaluated by flow cytometric detection of donor H-2K^{b} alloantigen expression by the transplanted (B6 × BALB/c) F1 lymphocyte subsets among the total blood leukocytes. In contrast to the overwhelming majority of myeloid cells (granulocytes and monocytes), which ap-

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry

dc_1678_19

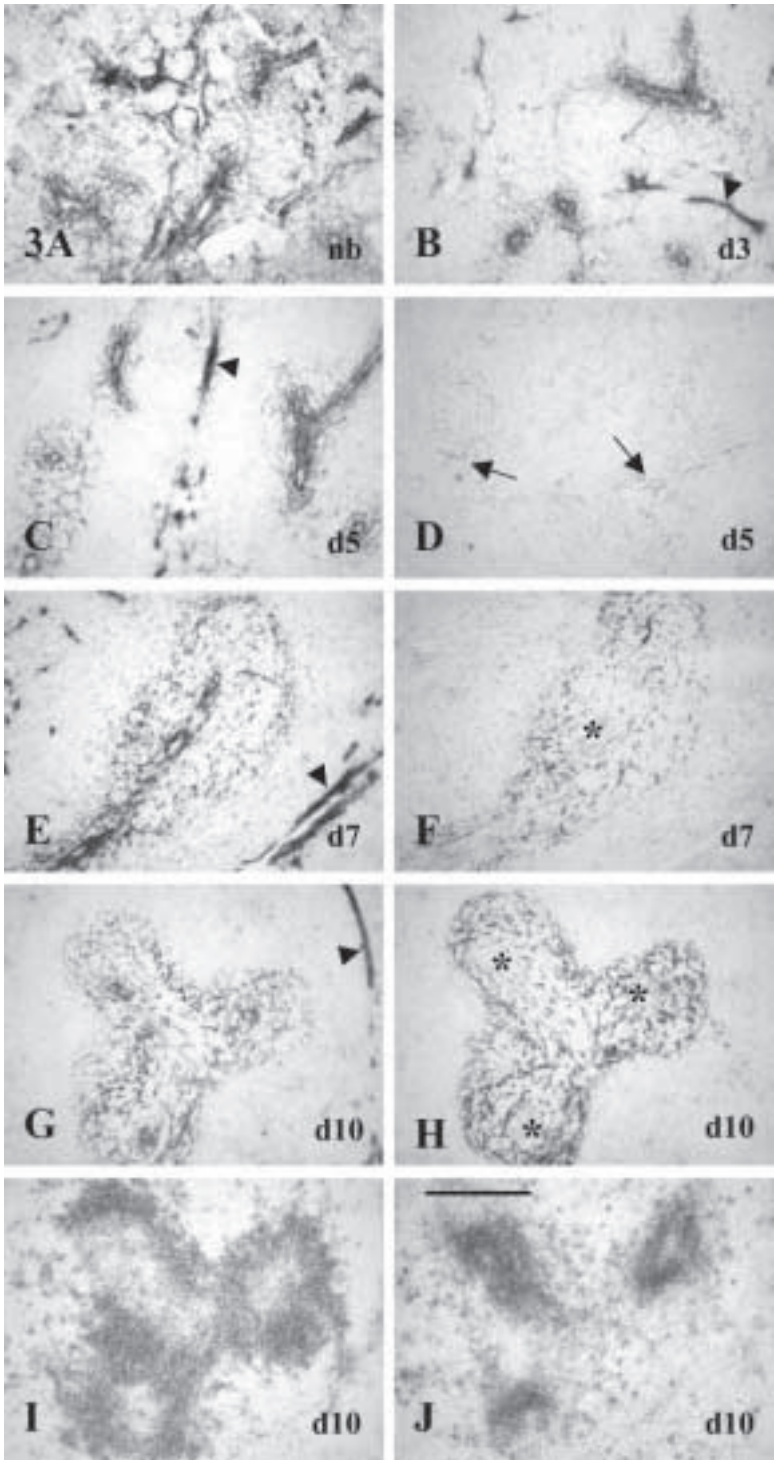


Figure 3 Postnatal development of white pulp fibroblast compartments. Tissue samples from newborn (nb) (age <12 hr, **A**), D3 (**B**), D5 (**C,D**), and D7 (**E,F**) pups. Sections were labeled with IBL-10 MAb (**A,B,C,E,G**), IBL-11 MAb (**D,F,H**), anti-CD45RA/B220 (**I**), and anti-CD3 (**J**). The age of samples is indicated at the lower right corner of insets. Serial section from D10 samples (**G–J**) indicate the last stage before the final adult-type tissue architecture illustrated in Figure 1. Asterisks label the position of the central arteriole. Arrowheads in **B,C,E,G** point to trabecular reactivity of IBL-10 MAb in the red pulp. Arrows in (**D**) label the first appearance of IBL-11 dim cells. Bar in (**J**) = 100 μm for all panels.

peared to be host derived, >90% of circulating lymphoid cells with lineage-restricted (B220 and CD3) differentiation markers expressed the donor-associated H-2K^b alloantigen in mice transplanted with pooled lymphocytes or with purified T- or B-cells, at a similar degree of donor cell load (Figure 5). We found that 1 week after the cell transfer, the tissue distribution of IBL-10– and IBL-11–positive fibroblast subsets was similar to that in normal mice, with some minor differences (Figure 6). We could observe the appearance of IBL-10^{hi} cells in the white pulp in all three groups of transplanted mice, and also the loosening of bundled

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry

dc_1678_19

Table 1 Sequence of tissue rearrangment processes of lymphocytic and fibroblast compartments in the postnatal spleen

	Marker/cell type			
Time	IBL-10	IBL-11	CD3 (T-cells)	B220 (B-cells)
NB	Trabecular and periarteriolar staining	Not detectable	Small clusters around the artery	Small groups of cells in the red pulp and along the central artery
D3	More-pronounced trabecular reaction, clusters of cells radiating from the central artery	Not detectable	As above	Thicker (8–15) layers of cells around the artery
D5	Reticular staining across the white pulp area	Faint expression at the peripheral regions of the white pulp without marginal zone–associated reactivity	3–8 layers of cells immediately around the central artery	Cells distanced from the central artery
D7	As above	More-intense reactivity in the white pulp area	As above	Uneven focal accumulation of B-cells along the peripheral part of cells surrounding the artery
D10	Appearance of clusters containing more-intensely stained cells in the central area of developing white pulp	Demarcation of IBL-11–positive cells around the marginal zone, paucity of staining at areas corresponding to the follicles	10–30 cell layers filling up the periarteriolar region	As above

NB, newborn.

IBL-11 cells at the peripheral parts of the white pulp, although the typical T-cell zone-associated reactivity of IBL-11–positive fibroblasts could not be established. We also found that this partial remodeling of IBL-11–positive reticular cells also occurred in recipients of F1 B-cells. The transfer of T-cells into SCID mice could also restore the presence of IBL-10^{hi} cells, which are typically restricted to the follicular area in normal mice. In that respect, there was no difference between the abilities of mixed or purified T- or B-cells to induce formation of IBL-10^{hi}–positive fibroblasts and rearrangement of IBL-11. However, the zonal enrichment of the IBL-10^{hi} cells at the periphery of follicles, as observed in normal mice, did not occur in T-cell–transplanted SCID recipients because these cells were distributed evenly in the white pulp. Moreover, the tendency of IBL-11 cells

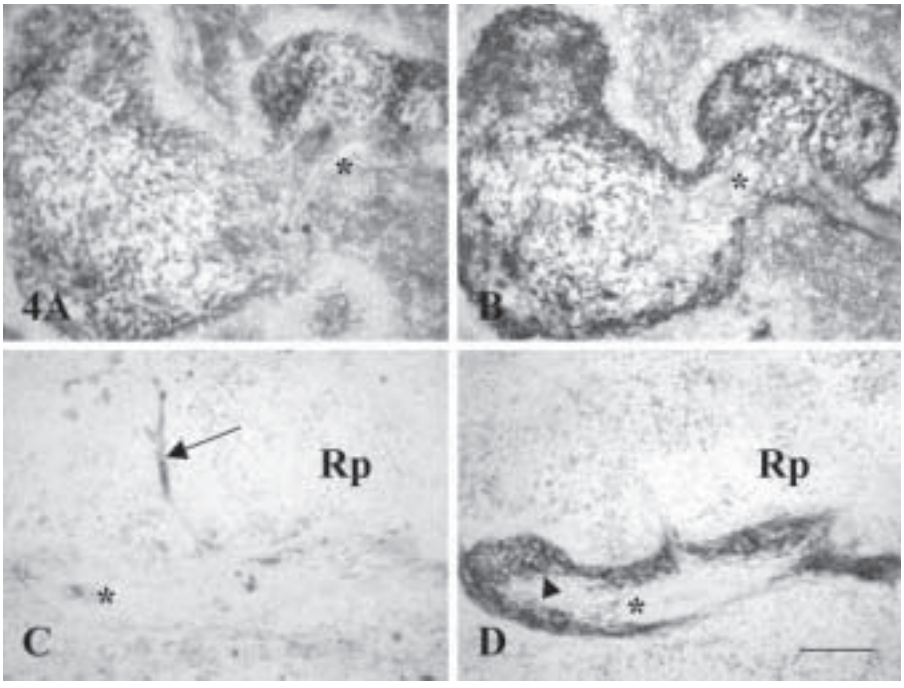
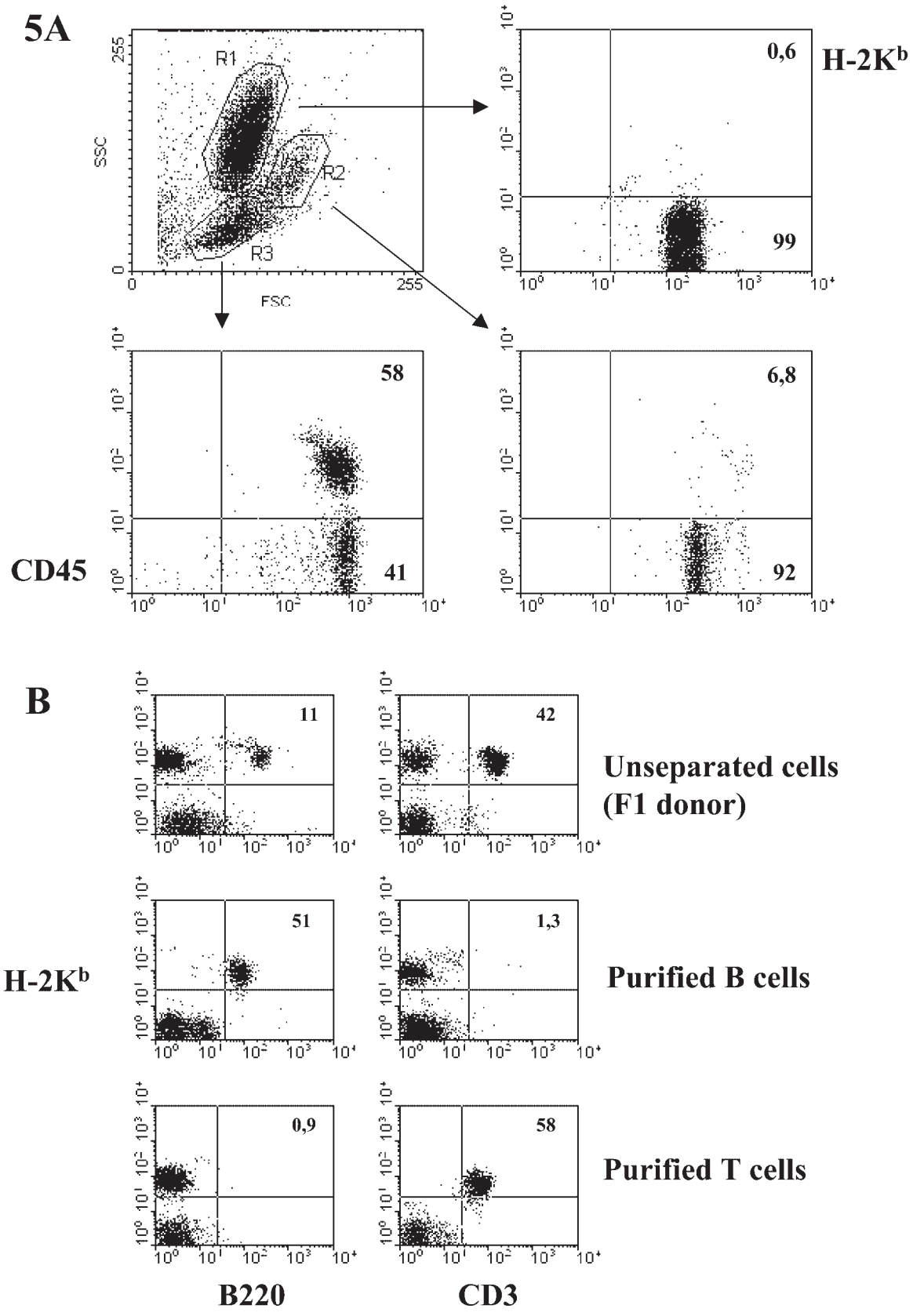


Figure 4 Effect of irradiation (**A**,**B**) and the SCID mutation (**C**,**D**) on the architecture of white pulp fibroblast subsets. Mice were irradiated, spleens were removed 48 hr later, and the serial sections were reacted with IBL-10 (**A**) or IBL-11 (**B**) MAb. (**C**) Arrow indicates a red pulp trabecule intensely stained with IBL-10 MAb. (**D**) Arrowhead points to a cluster of bundled IBL-11–positive fibroblasts. (**C**,**D**) Rp denotes red pulp. Asterisks identify central arteriole. Bar in (**D**) = 100 μm for panels **A**–**D**. The demonstrated reactions are a representative sample of results obtained on three separate occasions using groups of five mice.

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry

dc_1678_19

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry



dc_1678_19

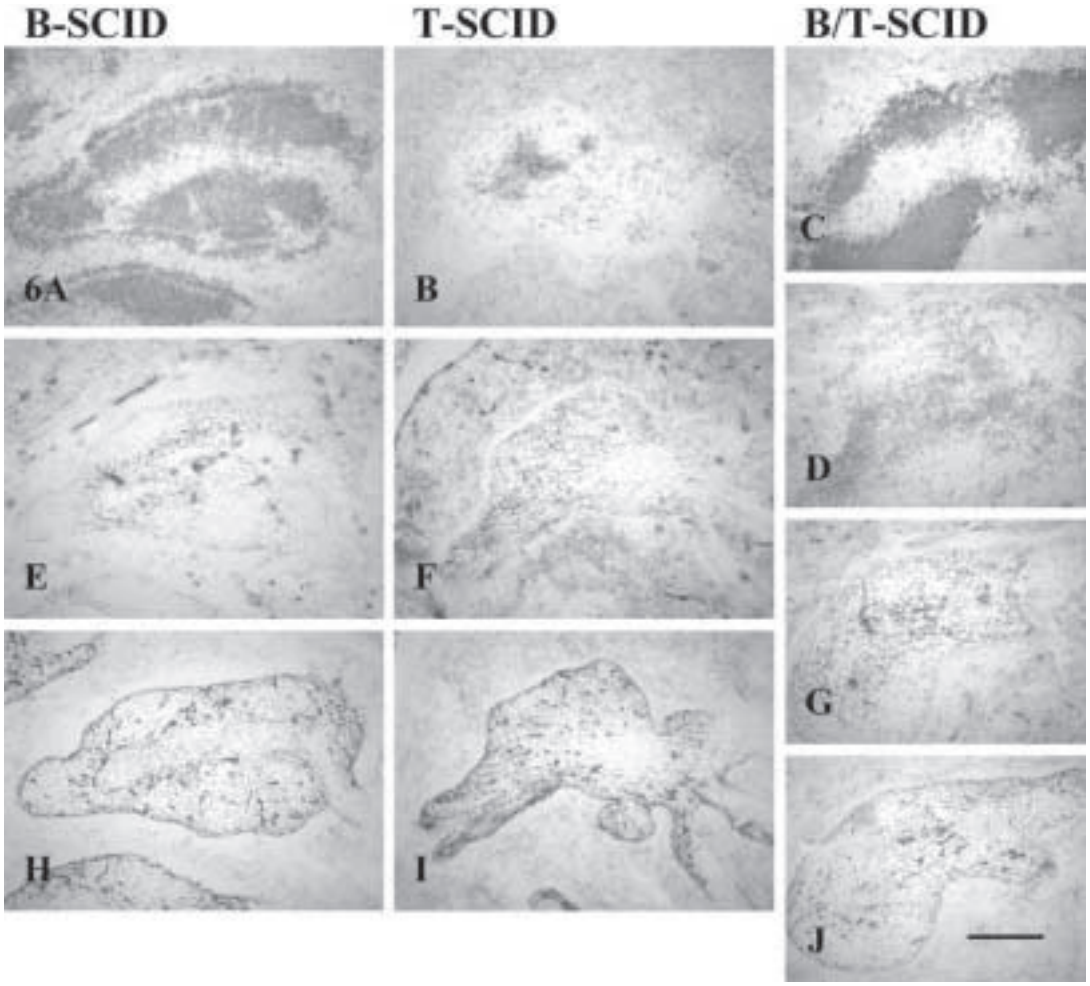


Figure 6 Reconstruction of SCID fibroblast compartments by the adoptive transfer of various donor cells (indicated at the top of columns). (**A,C**) Labeled with anti-B220 MAb. (**B,D**) CD3 expression. (**E–G**) labeled with IBL-10 MAb. (**H–J**) IBL-11 staining. Representative results obtained in three independent occasions using groups of five mice.

to be arranged around the marginal zone aspect of follicles and within the PALS (thus leading to the paucity of these cells in the central part of the follicle) was also diminished, because these fibroblasts were distributed throughout the partially restored white pulp in these mice without any indication of gradient formation (Table 2). Permitting the tissue remodeling in these reconstituted SCID mice to continue for 2 more weeks could not correct this abnormal pattern of IBL-10^{hi} and IBL-11 cell distribution (not shown).

Discussion

The aim of our present study was to generate new rat MAbs capable of identifying distinct components of the reticular fibroblastic scaffolding of the white pulp of murine spleen and to define their ontogeny during the early postnatal period. These cells have been rather poorly defined in terms of cell surface markers, which has also prompted us to compare the reactivities of these new MAbs to those developed earlier (Table 3).

Figure 5 Lymphoid chimerism in SCID mice after adoptive transfer of mixed or purified T and B cells from F1 donor mice 1 week after the cell transfer. (**A**) The various myeloid (granulocyte, R1 and monocyte, R2) donor/recipient chimerisms, according to their expression of donor H-2K^b alloantigen correlated with their CD45 display. Cells in R3 correspond to the lymphoid cells. Numbers indicate the frequency of cells in the given quadrants. (**B**) The results of mixed or purified T- and B-cell repopulation by F1 cells in SCID mice using the antibody combinations (indicated at the *x* and *y* axes, respectively). Numbers indicate the frequency of cells in the given quadrants. Data are representative of three independent experiments performed on three to five mice.

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry

dc_1678_19

Table 2 Effects of adoptive cell transfer on the fibroblast domain organization in SCID mice

Donor cells	Appearance of IBL-10^{hi} cells	Accumulation of IBL-10^{hi} cells at the follicle/PALS border zone	Redistribution of bundled IBL-11–positive cells from the periphery of PALS	Segregation of IBL-11–positive cells in the white pulp[a]
Mixed T/B- cells	+	+	+	+/–
T-cells	+	–	+	–
B-cells	+	+	+	+/–
None	–	–	–	–

[a]Establishment of a distinct rim of IBL-10–positive fibroblasts around the marginal zone and/or their preferential enrichment in the PALS.

Taking the ER-TR7 MAb as a pan-fibroblast marker (expressed by both red and white pulp fibroblasts), it is noteworthy that the B-cell area probably contains fewer fibroblasts than the PALS, in which the fibroblasts form a dense network. This compartmentalized distribution is controlled by LTβ/LIGHT, because in their absence, the normally uneven pattern becomes diffuse despite the presence of mature lymphoid cells in normal numbers (Ettinger et al. 1996). Therefore, the successful segregation of fibroblasts between T- and B-cell zones is not simply dependent on appropriate lymphocyte numbers (low in SCID or RAG$^{-/-}$) but is also dependent on the lymphocytes' inducer capability, which is severely impaired in the absence of LTβR engagement. It is also important that no alterations of the red pulp reticular arrangements detectable with ER-TR7 have been reported in LT deficiency (Tumanov et al. 2003), indicating that the formation of reticular fibroblasts in the red pulp is regulated in a different fashion compared with the white pulp, presumably acting on different cells. In that respect, it is important to emphasize that the splenic reactivities of both IBL-10 and IBL-11 MAbs are almost completely restricted to the white pulp area, although to its different compartments. IBL-10 was found to react against the white pulp with a slight follicular dominance (particularly at the follicle–PALS border), whereas IBL-11 had a clearly overwhelming reaction in PALS, with a follicular reactivity restricted to its perimeter, corresponding to the follicular aspect of the marginal zone. Other antibodies with a similarly skewed labeling pattern include the BP-3 clone detecting a CD38-related epitope shared by immature lymphocytes and stromal cells, and WP-1 MAb, both preferentially reacting with stromal cells in splenic follicles (McNagny et al. 1991; Yoshida et al. 1991). WP-1 strongly labels follicles in normal mice, whereas in SCID mice, it recognizes reticular cells in rudimental "follicular" areas adjoining the PALS (Yoshida et al. 1993). In addition to the intense follicular reaction in normal mice, there is also a sparse reaction in the PALS with WP-1 MAb, which appears to be missing in the SCID spleen. The BP-3 antigen has been reported to be present in both neonatal and SCID mice (McNagny et al. 1991), further confirming that it differs from both IBL-10 (inasmuch as it is very much reduced in SCID) and IBL-11 (inasmuch as it is absent in neonates). It was also reported that these BP-3–positive stromal components also include FDCs (Yoshida et al. 1995), marginal sinus lining cells, and other unidentified stromal cells (Ngo et al. 1999). According to our findings, however, neither IBL-10 nor IBL-11 had any significant coexpression with CD21/35 displayed by FDCs. Moreover, the follicular reactivity of WP-1 MAb appears to be much more extensive compared with either IBL-10 or IBL-11 MAb, suggesting that the WP-1 MAb may, similar to BP-3, also identify other follicular stromal cells, in addition to the fibroblasts (Yoshida et al. 1991).

With regard to the fibroblast components of the marginal zone area, it is interesting to note the close spatial relationship between the MAdCAM-1 reactiv-

Table 3 Main characteristics of monoclonal antibodies used for identifying reticular fibroblast in the murine spleen[a]

Clone/Marker	Regional reactivities			Presence in SCID	Reference
	T-cell area	B-cell area	Red pulp		
IBL-7/22	++	+	+	+	Balázs et al. 1999, and unpublished
ER-TR7	++	+	+	NR	Van Vliet et al. 1986
WP-1	+	++	–	+	Yoshida et al. 1991,1993
BP-3	+	++	–	+	McNagny et al. 1991
RPSC-2	+	–	++	+	Yoshida et al. 1991,1993
gp38	++	–	–	+	Farr et al. 1992
IBL-10	+	+	–	+/–	Present study
IBL-11	+	+	–	+	Present study

[a]Symbols indicate the relative regional intensity of expression.
NR, not reported.

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry

dc_1678_19

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry

ity of the sinus lining cells (Kraal et al. 1995) and the IBL-11 reactivity of adjacent fibroblasts. In humans, with no marginal sinus, the equivalent region, termed the perifollicular zone, contains MAdCAM-1–positive fibroblasts, which exhibit a number of unusual features, including the expression of smooth muscle α-actin, smooth muscle myosin, cytokeratin 18, and VCAM-1 and Thy-1 antigens, and which are thought to be involved in regulating T-cell migratory events (Steiniger et al. 2001). Although the MAdCAM-1 in unstimulated mice is primarily restricted to the sinus lining cells, its expression can also be observed at an extravascular location on FDCs in germinal centers, where the display of MAdCAM-1 antigen appears to delineate a continuous compartment originating from the marginal sinus (Balogh et al. 2002). We found that this upregulation of MAdCAM-1 by germinal center stromal cells in SRBC-immunized mice is not accompanied by the appearance of IBL-10 or IBL-11 epitopes on the MAdCAM-1–positive follicular cells in GCs, which suggests that the expression of these two markers is unrelated to the adaptation events of resting stromal elements to an altered lymphocytic microenvironment during GC formation.

The ability of transferred lymphoid cells to induce the appearance or redistribution of certain microenvironmental cells in immunodeficient SCID recipients has already been reported for FDCs and for reticular cells identifiable with WP-1 and RPSC-2 MAbs, respectively (Kapasi et al. 1993; Yoshida et al. 1993). The preference for a certain lymphocyte subset presenting inducer molecules, such as LTα/β2 or TNFα, appears to be lymphoid tissue specific because the lack of expression by B-cells has different degrees of inhibition of FDC differentiation in the spleen compared with that in lymph node or Peyer's patches (Tumanov et al. 2003). In our studies on the spleen, the transfer of various lymphoid cells at the same number could effectively induce the rearrangement of IBL-11–positive components, while it also initiated the appearance of IBL-10^{hi} cells in the follicular region. Our data indicate that the IBL-11–positive cells first appear at the peripheral part of the white pulp in both normal newborn and young adult SCID mice, but their subsequent rearrangement is probably related to the presence of mature lymphocytes and thus is impaired in SCID. It remains to be determined whether the remodeling of IBL-11–positive cells from their original bundled distribution is due to their migration or simply to their separation caused by the lymphocyte colonization. It was interesting to note, however, that this remodeling also occurred in the B-cell–reconstituted animals, despite the preferential T-zone expression of IBL-11–positive reticular cells in normal mice. Similarly, the IBL-10^{hi} cells in B-cell–transplanted SCID mice also appeared at the same density as in mice reconstituted with T-cells, arguing against a special T- or B-cell requirement for the establishment of this subset, in contrast to the primarily B-cell–dependent differentiation of FDCs (Wang et al. 2001). The failure to form an IBL-10^{hi} fibroblast margin at the border between T- and B-cell zones in T-cell–transplanted SCID recipients is probably related to the lack of B-cells. Therefore, we postulate that the B-cells (although effective inducers of their differentiation) probably restrict the infiltration of these cells into the deeper parts of the follicle, which was absent in these animals. Alternatively, the B-cells' role might be to direct the appearance of these (or similar cells) in the T-cell zone (Ngo et al. 2001). It appears, therefore, that although the major events can overwhelmingly be corrected by the transfer of B-cells alone into young adult SCID mice, it is likely that the establishment of normal structure requires the availability of both subsets at an earlier period. To define precisely the entity of other stromal reticular cells influenced by lymphoid cells and their ontogenic relationship with each other, a systemic approach to delineate these various reticular cells with a battery of available monoclonal antibodies appears desirable.

In summary, our new monoclonal antibodies detect two reticular fibroblast–associated antigens whose tissue expression is restricted to two different compartments of splenic white pulp. Their appearances have different ontogenic features and requirements for antigen receptor– bearing lymphocytes but they apparently display no particular lymphocyte preference for their induction and proper tissue distribution. Further analyses employing these new monoclonal antibodies in mutant mice with LT/TNF deficiency–related developmental abnormalities that affect the stromal architecture of peripheral lymphoid organs may further highlight the complex organization of the reticular fibroblast cells.

Acknowledgments

Supported by ETT grant No. 592/2003 from the Ministry of Health, Social and Family Affairs, Hungary (PB).

We gratefully acknowledge the expert contribution of Ms Judit Melczer in maintaining the hybridoma cells, and Prof Béla Somogyi for access to the FACSCalibur flow cytometer at the Department of Biophysics. For rat MAbs IBL-10 and IBL-11, please contact PB.

Literature Cited

Balázs M, Grama L, Balogh P (1999) Detection of phenotypic heterogeneity within the murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies IBL-7/1 and IBL-7/22. Hybridoma 18:177–182

Balázs M, Horváth G, Balogh P (1998) Simple determination of donor/host origin and donor leukocyte subsets in rat-mouse chimeras. J Immunol Methods 218:117–121

dc_1678_19

Balázs M, Horváth G, Grama L, Balogh P (2001) Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. Cell Immunol 212:126–137

Balogh P, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK (2001) Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. Cell Immunol 214:45–53

Balogh P, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK (2002) Appearance and phenotype of murine follicular dendritic cells expressing VCAM-1. Anat Rec 268:160–168

Ettinger R, Browning JL, Michie SA, van Ewijk W, McDevitt HO (1996) Disrupted splenic architecture, but normal lymph node development in mice expressing a soluble lymphotoxin-beta receptor-IgG1 fusion protein. Proc Natl Acad Sci USA 93:13102–13107

Farr AG, Berry ML, Kim A, Nelson AJ, Welch MP, Aruffo A (1992) Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. J Exp Med 176:1477–1482

Fu YX, Chaplin DD (1999) Development and maturation of secondary lymphoid tissues. Annu Rev Immunol 17:399–433

Gretz JE, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S (1996) Sophisticated strategies for information encounter in the lymph node: the reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic. J Immunol 157:495–499

Kapasi ZF, Burton GF, Shultz LD, Tew JG, Szakal AK (1993) Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. J Immunol 150:2648–2658

Karlsson MC, Guinamard R, Bolland S, Sankala M, Steinman RM, Ravetch JV (2003) Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. J Exp Med 198:333–340

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495–497

Kraal G (1992) Cells in the marginal zone of the spleen. Int Rev Cytol 132:31–74

Kraal G, Schornagel K, Streeter PR, Holzmann B, Butcher EC (1995) Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen. Am J Pathol 147:763–771

Liakka KA, Autio-Harmainen HI (1992) Distribution of the extracellular matrix proteins tenascin, fibronectin, and vitronectin in fetal, infant, and adult human spleens. J Histochem Cytochem 40:1203–1210

Mackay F, Majeau GR, Lawton P, Hochman PS, Browning JL (1997) Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice. Eur J Immunol 27:2033–2042

MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zuniga E, Cook MC, et al. (2003) Extrafollicular antibody responses. Immunol Rev 194:8–18

Martin F, Kearney JF (2002) Marginal-zone B cells. Nature Rev Immunol 2:323–335

McNagny KM, Bucy RP, Cooper MD (1991) Reticular cells in peripheral lymphoid tissues express the phosphatidylinositol-linked BP-3 antigen. Eur J Immunol 21:509–515

Mebius RE (2003) Organogenesis of lymphoid tissues. Nature Rev Immunol 4:292–303

Ngo VN, Cornall RJ, Cyster JG (2001) Splenic T zone development is B cell dependent. J Exp Med 194:1649–1660

Ngo VN, Korner H, Gunn MD, Schmidt KN, Riminton DS, Cooper MD, Browning JL, et al. (1999) 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 189:403–412

Nolte MA, Belien JA, Schadee-Eestermans I, Jansen W, Unger WW, van Rooijen N, Kraal G, et al. (2003) A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. J Exp Med 198:505–512

Nolte MA, Hoen EN, van Stijn A, Kraal G, Mebius RE (2000) Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. Eur J Immunol 30:626–634

Ocklind G, Talts J, Fassler R, Mattsson A, Ekblom P (1993) Expression of tenascin in developing and adult mouse lymphoid organs. J Histochem Cytochem 41:1163–1169

Skibinski G, Skibinska A, Stewart GD, James K (1998) Enhancement of terminal B lymphocyte differentiation in vitro by fibroblast-like stromal cells from human spleen. Eur J Immunol 28: 3940–3948

Steiniger B, Barth P, Hellinger A (2001) The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration? Am J Pathol 159:501–512

Taylor PR, Pickering MC, Kosco-Vilbois MH, Walport MJ, Botto M, Gordon S, Martinez-Pomares L (2002) The follicular dendritic cell restricted epitope, FDC-M2, is complement C4; localization of immune complexes in mouse tissues. Eur J Immunol 32:1888–1896

ten Dam GB, Hafmans T, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH (2003) Differential expression of heparan sulfate domains in rat spleen. J Histochem Cytochem 51:727–739

Tumanov AV, Grivennikov SI, Shakhov AN, Rybtsov SA, Koroleva EP, Takeda J, Nedospasov SA, et al. (2003) Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting. Immunol Rev 195:106–116.

Van Vliet E, Melis M, Foidart JM, Van Ewijk W (1986) Reticular fibroblasts in peripheral lymphoid organs identified by a monoclonal antibody. J Histochem Cytochem 34:883–890

Wang Y, Wang J, Sun Y, Wu Q, Fu YX (2001) Complementary effects of TNF and lymphotoxin on the formation of germinal center and follicular dendritic cells. J Immunol 166:330–337

Yoshida K, Kaji M, Takahashi T, van den Berg TK, Dijkstra CD (1995) Host origin of follicular dendritic cells induced in the spleen of SCID mice after transfer of allogeneic lymphocytes. Immunology 84:117–126

Yoshida K, Matsuura N, Tamahashi N, Takahashi T (1993) Development of antigenic heterogeneity in the splenic meshwork of severe combined immunodeficient (SCID) mice after reconstitution with T and B lymphocytes. Cell Tissue Res 272:1–10

Yoshida K, Tamahashi N, Matsuura N, Takahashi T, Tachibana T (1991) Antigenic heterogeneity of the reticular meshwork in the white pulp of mouse spleen. Cell Tissue Res 266:223–229

The Journal of Histochemistry & Cytochemistry

dc_1678_19

Molecular Immunology 46 (2008) 1–7

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm

Review

Fibroblastic reticular cells of the peripheral lymphoid organs: Unique features of a ubiquitous cell type

Péter Balogh[a,*], Viktória Fisi[a], Andras K. Szakal[b]

[a] Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, H-7643 Pécs, Szigeti út 12, Hungary
[b] Department of Anatomy and Neurobiology, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23298, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 June 2008
Accepted 6 July 2008
Available online 21 August 2008

Keywords:
Lymphoid tissue
Stroma
Fibroblastic reticular cells
Heterogeneity
Function
Phenotype
Development

ABSTRACT

The highly ordered structure in peripheral lymphoid tissues is maintained by continuous interactions between their hemopoietic and stromal components. The main reticular cell type, fibroblastic reticular cells (FRCs) emerged as a considerably heterogeneous group of the stroma. These cells have diverse roles beyond architectural scaffolding. Their functions include the formation of nests for recirculating lymphocytes with subset-preference and a dynamic filtration system for facilitating encounter between antigen, antigen-presenting cells and antigen-receptor bearing cells. FRCs are influenced by lymphocyte-derived morphogenic signals and factors necessary for lymphoid tissue formation and lymphocyte homeostasis. Moreover, FRCs may also interact with other stromal elements during both lymphoid organ development and immune responses. FRCs are profoundly affected by pathogens, which may limit the lymphoid cells' capacity to establish efficient protection. This review focuses on the ontogenic, phenotypic and functional complexities of FRCs and their role in the stromal rearrangement of lymphoid tissues.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In humans and other mammalians efficient protection against invading pathogens requires the presence of highly compartmentalized peripheral lymphoid organs. These are anatomical sites for the initiation of specific immune responses. Such organs include the spleen, lymph nodes, solitary intestinal lymphoid nodules, Peyer's patches and isolated lymphoid follicles in intestines as well as in other mucosal layers. Regardless of their individual anatomical location, developmental characteristics or structural features, a basic organizational principle they all share is the compartmentalization of their mature mobile hemopoietic elements into T- and B-cell determined areas. This segregation reflects the regional distribution of sessile stromal constituents within peripheral lymphoid organs.

The term "stromal" encompasses a broad range of stationary cells with various developmental origins. It may even include hemopoietic cells with restricted migratory capacity. Of these sessile cells, fibroblastic reticular cells (FRCs) as basic mesenchymal cell type are ubiquitously found in a close association with other cells (Gretz et al., 1996). In the spleen these cells include the marginal zone (MZ) macrophages as relatively static hemopoietic cells, as well as sinus-lining endothelial cells of the marginal sinus (in mice) or other ill-defined perifollicular mesenchymal cells (in humans) displaying MAdCAM-1 addressin (Steiniger et al., 2001; Mebius et al., 2004). This marker may also be expressed by adjacent non-endothelial cells, probably related to FRCs (Tanaka et al., 1996). In the follicles of the cortical area of lymph nodes and in the splenic white pulp, follicular dendritic cells (FDCs), with disputed developmental origin, are responsible for the follicular organization and support for the expansion of B cells subsequent to their antigen-receptor mediated activation (Tew et al., 1997; Allen and Cyster, 2008). FDCs share a number of cell surface characteristics with FRCs including CD44, ICAM-1, and have also been demonstrated to require exposure either to FRC-derived factors, or substances influencing fibroblastic growth, for their functional activity *in vitro* (see below).

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; FDC, follicular dendritic cell; FRC, fibroblastic reticular cell; GPI, glycosyl-phosphatidyl-inositol; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; Ig, immunoglobulin; IL-7, interleukin 7; LT, lymphotoxin; LTi, lymphoid tissue inducer cell; mAb, monoclonal antibody; MAdCAM-1, mucosal addressin cell adhesion molecule-1; MARCO, macrophage receptor with collagenous structure; MZ, marginal zone; NCAM, neural cell adhesion molecule; NF-κB, nuclear factor-κB; PNAd, peripheral lymph node addressin; RAG, recombination activating gene; RF, reticular fibers; $S1P_1$ and $S1P_3$, sphingosine-1-receptor type 1 and 3; SCID, severe combined immune deficiency; Sn, sialoadhesin; TNF, tumor necrosis factor; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; VEGF-R3, vascular endothelial growth factor receptor type-3.

* Corresponding author. Tel.: +36 72 536 001/6524; fax: +36 72 536 288.
E-mail address: peter.balogh@aok.pte.hu (P. Balogh).

0161-5890/$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.molimm.2008.07.014

dc_1678_19

In secondary lymphoid tissues, FRCs together with reticular fibers (RFs) and fibrous extracellular matrix (ECM) bundles form the reticular network that serves as a scaffold for the three-dimensional structure of these organs (Gretz et al., 1997; Kaldjian et al., 2001; Lokmic et al., 2008). Both components (cellular and ECM) are arranged in a reticular fashion, thus creating a continuous, yet highly diverse, network (Kaldjian et al., 2001). Previously the FRCs were attributed with creating and maintaining the organized architecture of lymphoid tissues as a platform for the adherence and migration of lymphocytes. Correspondingly, the distribution of various ECM components such as collagen types I and III as well as laminin subtypes in lymphoid tissues also shows a high degree of heterogeneity (Kaldjian et al., 2001; Lokmic et al., 2008). Accumulating evidence now indicates that FRCs' roles also include the formation of a dynamic system for facilitating liquid transport by creating a 'conduit' system (Kaldjian et al., 2001). In addition, they also actively direct the migration of lymphocytes for their guided movement between and within separate lymphoid tissue compartments. Elegant two-photon laser scanning microscopic studies have recently established that the directed migration of lymphoid cells as well as their sorting crucially depend on continuous interaction with FRCs during their random movement, with occasional encounters with antigen-loaded dendritic cells (Bajénoff et al., 2006). During immune responses this migration pattern is redirected by an altered chemokine milieu (Worbs et al., 2007), while FRCs also adjust during immune responses to accommodate the rapid expansion of lymphoid cells within a restricted tissue volume (Katakai et al., 2004a,b). In addition, by influencing the survival of T cells FRCs also act as peripheral regulators of T-cell homeostasis by producing IL-7 (Link et al., 2007). Recent data also indicate that their damage during infection by pathogenic agents influences the immune system's ability to clear infections (Mueller et al., 2007; Scandella et al., 2008). Thus – in terms of cell mass – a relatively minor set in peripheral lymphoid tissues have a severe impact on how efficiently the substantially more numerous hemopoietic cells' potential to eliminate pathogens may prevail.

The differentiation of various stromal elements – including FRCs – is determined by complex developmental circuits between their immature precursors and fetal liver-derived hemopoietic progenitors capable of inducing stromal maturation (Mebius, 2003). This series of developmental events requires an extensive range of molecular mediators, including various members of lymphotoxin/tumor necrosis factor (LT/TNF) ligand-receptor family, their NF-κB signaling pathways, chemotactic cytokines, interleukins and their receptors, adhesion molecules and homing receptors (Randall et al., 2008). In addition to their role in secondary lymphoid organ formation, similar events were also demonstrated to contribute to the lymphoid neogenesis in chronic inflammations, manifested as the ectopic formation of structures resembling organized lymphoid tissues (Drayton et al., 2006).

The quest to understand the formation of secondary lymphoid organs as principal sites for hosting adaptive immune responses has aroused a renewed interest extending beyond the morphological description of their architecture. In addition, the role of stromal cells to influence the survival and activity of hemopoietic/lymphoid "parenchymal" cells may also render these cells an attractive therapeutic target for ameliorating diseases coupled with lymphoid neogenesis. The availability of various mutant mouse strains and new analytical tools have considerably expanded the means of addressing the functions and importance of FRCs in peripheral lymphoid organs as well, thus necessitating an update on their characteristics.

2. FRC subsets as defined by their topographic and phenotypic features

2.1. General fibroblastic organization of the peripheral lymphoid tissues

FRCs form a loose network in which densely packed lymphocytes are distributed. Due to their relatively rare frequency, the identification of FRCs requires their immunohistological detection (Van Vliet et al., 1986). Furthermore, the assessment of the relationship of FRCs with neighboring cells and extracellular matrix components needs electron microscopic analysis (Gretz et al., 1997; Lokmic et al., 2008). In addition to in situ detection by immunohistology, the differential labeling of certain FRC subsets with specific mAbs could also be exploited for enriching them by cell sorter, thus providing valuable material for *in vitro* functional studies and gene expression analyses (Link et al., 2007).

These approaches have revealed some intriguing features of the FRCs architecture in peripheral lymphoid organs. In these tissues FRCs are not embedded in extracellular matrix components, but enwrap these proteins in a fibrillar arrangement, forming together the reticular network. In this setting the direct access of surrounding lymphoid cells to FRCs within the strands of reticular network is not hampered by ECM, but this network serves as core for a potentially elastic and flexible scaffold. In addition, FRCs also form a characteristic non-endothelial drainage system connecting lymphatic or blood vessels to avascular territories for facilitating the delivery of soluble antigens as well as low molecular weight compounds, such as chemokines (Gretz et al., 1997; Lokmic et al., 2008). Thus in lymph nodes this conduit system connects the subcapsular sinus and deeper parenchyma, and it may also reach HEV. In the white pulp of the spleen a similar structure has been identified which links the marginal sinus and central artery, with collagen fibers ensheathed by FRCs as basic structural elements in both organs (Nolte et al., 2003). Depending on the type and region of the peripheral lymphoid organs, considerable differences were noted between spleen compartments and lymph nodes both in molecular composition and physical characteristics, such as the diameter of these bundles (Gretz et al., 1997; Lokmic et al., 2008).

Previous observations indicated that, using ER-TR7 rat monoclonal antibody (mAb) against a pan-fibroblast marker in mice, the T- and B-cell zones of lymphoid tissues have different labeling densities, thus revealing a more pronounced appearance of FRCs in the T-zone (Van Vliet et al., 1986). Although ER-TR7 mAb reacts with an as yet unidentified secreted component present in the conduit system (Katakai et al., 2004a,b), in dual staining with the detection of desmin intermediate filament it provides valuable information on the general organization pattern of reticular meshwork (Link et al., 2007). Similar results were obtained by employing IBL-7/22 mAb against a shared endothelial-fibroblast marker, with a characteristic T-zone predominance in staining (Balázs et al., 1999; Balogh et al., 2004). It appears, therefore, that the T-cell regions have a substantially denser FRC-network than the follicles in both spleen and lymph nodes.

2.2. Phenotypic characteristics of T-zone FRCs

In addition to these quantitative differences found by pan-fibroblastic reagents, the use of other antibodies permitted the selective identification of FRC subsets in the T-cell zone of spleen and lymph nodes. Thus the expression of both gp38/podoplanin, a GPI-anchored protein and IBL-11 marker, are reliable features for the FRCs situated in these lymphoid tissue compartments, with slight differences in topography (Farr et al., 1992; Balogh et al., 2004). Recent findings in murine lymph nodes indicate that

dc_1678_19

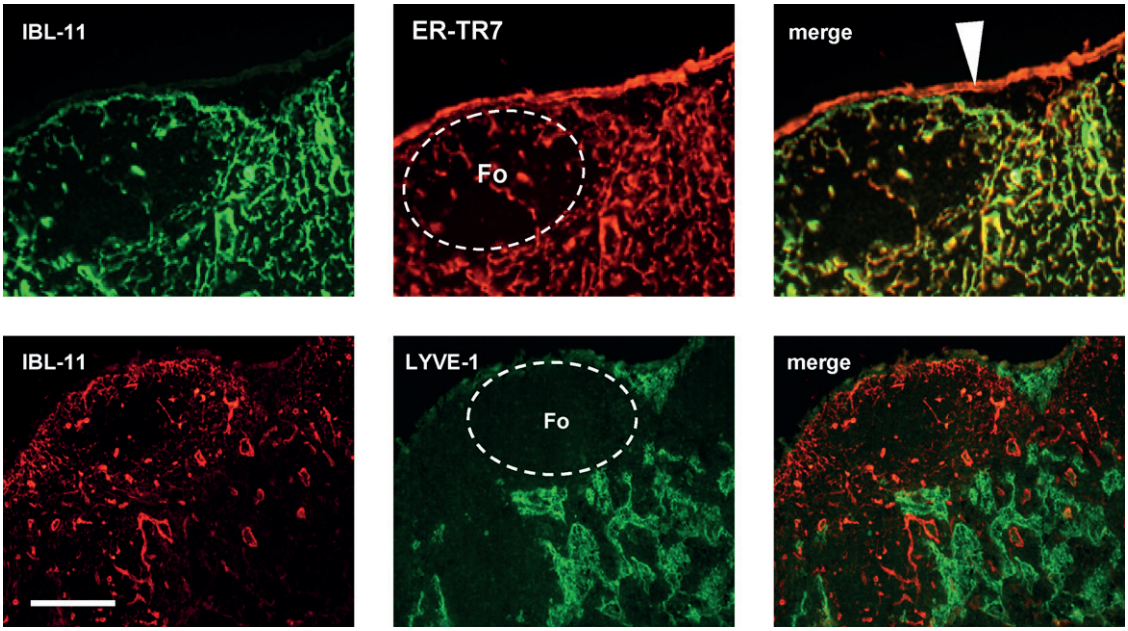


Fig. 1. The upper row illustrates the distribution of FRC subsets in the peripheral lymph node of a BALB/c mouse. Serial sections from lymph nodes were labeled with mAbs against FRCs. Pan-fibroblastic mAb ER-TR7 was detected with phycoerythrin-conjugated anti-rat IgG, whereas biotinylated IBL-11 mAb was revealed using FITC–streptavidin conjugate. The regions encircled by the dashed line correspond to the same follicle at different sectioning planes. Note the similar dominance of non-B zone reactivity with both anti-FRC mAbs and their overlapping staining (appearing as yellow in the merge), whereas the capsule contains fibroblasts expressing the pan-FRC marker ER-TR7 only (arrowhead). IBL-11 marker is not shared by LYVE-1$^+$ lymphatic endothelial cells (lower row). Although closely positioned in the subcapsular area and in the deeper cortical regions, IBL-11$^+$ FRCs and LYVE-1$^+$ lymphatic endothelium are clearly distinguishable (100 μm scale bar).

gp38/podoplanin is also expressed by non-FRCs, including CD35-positive FDCs and lymphatic endothelial cells producing LYVE-1 and VEGF-R3, respectively (Link et al., 2007). In lymph nodes with ER-TR7 reactive fibroblastic capsule, the subcapsular sinus is supported by a shell of IBL-11 positive RFC meshwork; however, the lymphatic capillaries expressing gp38 or LYVE-1 do not stain with IBL-11 mAb (Fig. 1). Similarly to other lymphatic endothelium markers, such as LYVE-1 or VEGFR-3, podoplanin/gp38 is regulated by Prox-1 transcription factor. In the absence of podoplanin the patterning of lymphatic capillaries is abnormal, resulting in severe lymphedema (Schacht et al., 2003). Due to the immediate postnatal death caused by the *podoplanin*$^{-/-}$ mutation, it was not possible to determine the effect of absence of gp38 on the postnatal maturation of lymphoid stromal elements including FRCs and FDCs.

Similarly to smooth muscle cells and myofibroblasts, T-zone associated FRCs express α-smooth-muscle actin and desmin, which may contribute to the regulation of liquid flow within the conduits formed by FRCs via cellular contractions (Hinz et al., 2001; Hinz and Gabbiani, 2003; Link et al., 2007). For the efficient recruitment of T cells, T-zone FRCs produce CCL19 and CCL21 chemokines, recognized by the common receptor CCR7 expressed by T cells and dendritic cells (Luther et al., 2000; Cyster, 2005; Link et al., 2007), thus enhancing the probability of specific encounter between antigen-laden dendritic cells and antigen-receptor bearing T cells.

2.3. Follicles: mixed scaffolding formed by FDCs and FRCs

In contrast to the T-cell zone, where a large degree of overlapping can be observed between desmin/gp38-positive FRCs and IBL-11/ER-TR7 reactivity (Link et al., 2007; Bovari et al., 2007), the reticular composition of follicles in both spleen and lymph nodes is considerably more complicated to determine. While the majority of stromal cells in the follicles are FDCs (identifiable by their high-level expression of complement receptor CD35), a scattered labeling with ER-TR7 also reveals detectable FRCs, even though with a marked paucity in labeling density relative to the T-cell zone. In addition to ER-TR7-reactive FRCs and CD35-positive FDCs, a considerable population of non-FDC subset is also likely to be present, as defined by their labeling with BP-3 mAb against mouse CD157. Based on the expression of CD35, these reticular cells could be divided into CD35$^+$/BP-3$^+$ double positive FDCs and CD35$^-$/BP-3$^+$ subsets, located at the central and a more peripheral region of the splenic follicles underneath the MZ region in the spleen, respectively (Ngo et al., 1999). The peripheral follicular reactivity of IBL-11 mAb, however, does not overlap with the expression of CD21/35, indicating that these FRCs are distinct from the FDC lineage (Bovari et al., 2007). This finding is also supported by the presence of IBL-11 positive FRCs in SCID mice where FDCs are absent (Kapasi et al., 1993; Balogh et al., 2004). Thus the stromal scaffolding of follicles is comprised primarily of FDCs and, to a lesser degree, of various FRC subsets, which appear more densely packed at the periphery of follicles. For the bulk of B cells to enter the follicles, therefore, a switch must be made upon leaving the FRC-rich T-cell zone, and finding the FDCs as dominant scaffolding partner for further guidance (Bajénoff et al., 2006), directed by CXCL13 chemokine (Cyster, 2005). The region where this transfer may take place is even less defined. In this respect it is worthwhile to mention that the increased reactivity of IBL-10 mAb at the border region between the T-zone with FRCs may indicate an FRC population involved in this switch process (Balogh et al., 2004). A substantial fraction of IBL-10$^+$ FRCs both in spleen and lymph nodes co-express gp38/podoplanin and partially co-localize with laminin (Luther, personal communication).

2.4. Marginal zone FRCs: multiple partnering

In addition to T-zone reactivity within the central white pulp, IBL-11 and BP-3 mAbs also outline the circumferential reticulum at the outermost rim of follicles (Ngo et al., 1999; Balogh et al., 2004). This peripheral follicular arrangement of FRCs closely follows the positioning of splenic marginal sinus-lining cells, expressing

dc_1678_19

MAdCAM-1 glycoprotein (Kraal et al., 1995). These MAdCAM-1^+ sinus-lining cells in a heterogeneous manner co-express L1 (also named neuronal cell adhesion molecule/NCAM, CD171), an Ig superfamily adhesion glycoprotein (Wang et al., 2000a,b). The presence of vimentin in these cells may suggest their ontogenic relatedness to FRCs, thus raising the possibility for the fibroblastic origin of at least some sinus-lining cells in the marginal sinus (Tanaka et al., 1996). The absence of L1 induces a substantial disorganization of sinus structure, and an impaired reorganization of cortical sinuses in lymph nodes undergoing immune stimulation. Whether L1 maintains the integrity of spleen sinus-lining cells by binding laminin or by homologous association with L1 molecule expressed by neighboring cells, is currently unknown. In their spleens L1 KO mice have irregular white pulp border containing separated sinus-lining cells and discontinuous laminin distribution (Wang et al., 2000a,b). These FRCs may provide structural support for both MAdCAM-1 positive sinus-lining cells and sialoadhesin-positive (Sn) MZ macrophages during their gradual accumulation within the MZ of spleen and underneath the subcapsular sinus of peripheral lymph nodes in the early postnatal period (Fisi et al., in preparation). In humans the equivalent area of spleen also contains MAdCAM-1-positive cells. However, these cells do not form marginal sinus, but are arranged in a concentric fashion in the perifollicular zone. This subset can be identified by their VCAM-1 (CD106), Thy-1 (CD90) and VAP-1 (vascular adhesion protein-1) expression, latter mediating the binding of lymphocytes to endothelium in inflamed tissues. The perifollicular FRCs both in humans and mice also stain positive for intracellular smooth muscle α-actin, smooth muscle myosin and desmin (Steiniger et al., 2001). Similarly to humans, Thy-1 is also produced by murine splenic fibroblast subsets in a heterogeneous manner with differential capacities to support *in vitro* lymphocyte functions (Borrello and Phipps, 1996). In addition to perifollicular FRCs in the spleen, Thy-1 expression by lymph node FDCs was also noted using AS02 mAb in humans (Bofill et al., 2000). In mouse lymph node, however, the non-lymphoid expression of Thy-1 in germinal centers is restricted to tingible body macrophages in the dark zone, whereas FDCs in the light zone do not display Thy-1 (Smith et al., 1988).

Fig. 2 summarizes the reagents reportedly used to identify FRCs and their subsets in mice, and illustrates their schematic tissue reactivity in spleen.

3. Developmental regulation of fibroblastic domains—changing cellular partners and topographic effects

With the identification of committed hemopoietic and mesenchymal stromal precursors as well as the molecular participants (chemokines, adhesion molecules, signaling components), our understanding of the prenatal ontogeny of secondary lymphoid tissues has considerably expanded (Mebius, 2003; Randall et al., 2008). Considering the importance of FRCs as basic scaffolding elements, however, surprisingly little is known about their developmental processes and precise role during the formation and function of peripheral lymphoid organs.

The typical approach for assessing the ontogeny of reticular meshwork is to analyze its cellular and topographic composition during prenatal and early postnatal period in normal and mutant mouse strains in various experimental conditions, including the use of blocking antibodies, cell transfer experiments, or inducible gene expression/silencing procedures. Although these efforts have resulted in detailed structural descriptions, they are in many cases hampered by the unknown molecular and functional characteristics of antigenic markers that have been used to identify specific fibroblastic cells, with only a handful of reagents available. Furthermore, the fibroblastic nature/origin of mesenchymal cells identified via the expression of established markers (VCAM-1 and MAdCAM-1) has in many cases remained undetermined. Importantly, these markers are shared with other stromal components at their various developmental or activation status. The differential expression of FRC markers in mouse strains with similar mutations (e.g. SCID vs. RAG-deficiency) indicates that their production is regulated in a highly complex fashion, possibly in an organ-specific manner. Thus SCID mice display MAdCAM-1 in their marginal sinus-lining cells at normal level, whereas in the spleen of RAG-deficient mice its production is sparse (Gonzalez et al., 1998; Crowley et al., 1999). Also, FRCs in SCID mutants were reported to express podoplanin/gp38 in the white pulp of spleen, whereas in RAG-deficiency it is absent (Farr et al., 1992; Withers et al., 2007).

3.1. Learning to become functional lymphoid FRC—the impact of lymphoid cells

Ontogenic studies indicate an ordered hierarchy of the appearance of various FRC-associated surface markers. Thus ER-TR7 marker is readily detectable in embryonic lymph nodes and spleen and, by birth, ER-TR7-positive FRCs are arranged in an elaborate meshwork. FRCs or related cells expressing VCAM-1 antigen in the adventitia of central arterioles can also be identified relatively early during the embryonic development of spleen (Withers et al., 2007). At this stage they are positioned in a close steric relationship with lymphoid cells expressing markers characteristic for lymphoid tissue inducer (LTi) cells. These latter cells are required for the initiation of both peripheral lymph node formation and splenic white pulp development; however, the details of their relationship with the surrounding FRCs are yet to be elucidated (see below). As a subset-reactive marker, IBL-10 is also present in neonatal spleen, mainly enriched in the white pulp surrounding the central arteriole (Balogh et al., 2004). Therefore, it is conceivable that following the early (up to embryonic days 15–16), LT-independent phase of fetal lymphoid stromal development, sufficient number of lymphoid progenitors will initiate the early induction of fibroblastic differentiation by providing morphogenic signals (Withers et al., 2007). These may include interactions between VCAM-1 and its α4β1 integrin ligand, as well as CXCL13 ligand and CXCR5 chemokine receptor. In addition, the formation of ER-TR7-positive meshwork also indicates a considerable expansion of immature FRCs.

In contrast to ER-TR7 or VCAM-1, expression of gp38/podoplanin and IBL-11 is delayed until the end of first postnatal week. This indicates that other cells (either absent or ineffective prior to this period) than LTi may take over to exert important inductive functions, as LTi cells at this period are vastly outnumbered by mature lymphoid cells. Also, the lack of podoplanin expression in RAG KO and other FRC-associated markers in SCID mice indicate that mature lymphoid cells must supplement other signals than LT/TNF expressed by LTi cells. Thus B cells are attributed with the capacity to drive the assembly of regional stromal architecture. This process involves both the formation of FDCs in SCID (Kapasi et al., 1993) and the differentiation of T-zone FRCs by inducing the expression of podoplanin and chemokines CCL19 and CCL21 in RAG KO mice (Ngo et al., 2001). Furthermore, the period in which this maturation phenomenon may occur is flexible, where a major requirement for the preserved inducibility appears to be the engagement of LTβR by its ligand during the early postnatal period (Withers et al., 2007). Depending whether this interaction is followed by subsequent association between stromal progenitors and mature lymphocytes, the differentiation may be permitted to proceed, as observed during normal tissue formation. In RAG KO mice with the absence of antigen-receptor bearing lympho-

dc_1678_19

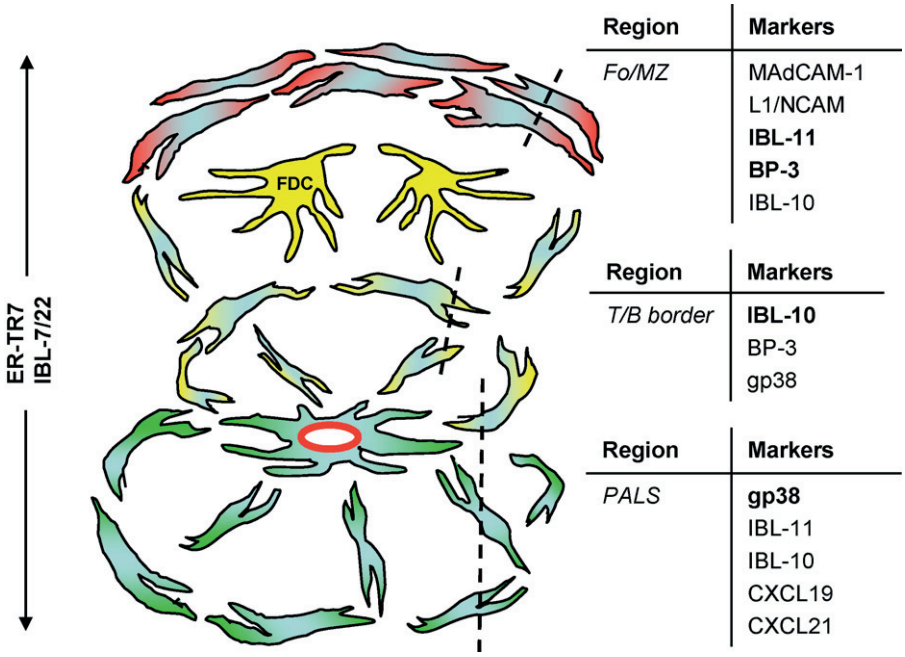


Fig. 2. Regional heterogeneity of FRC subsets in the mouse splenic white pulp. Instead of the typically well demarcated separation of lymphocytic compartments, the FRCs appear to display mixed phenotypes for most antibodies, necessitating the distinction into follicle/marginal zone (Fo/MZ), T/B border and PALS (labeled by the dashed lines), instead of the usual MZ, follicle and PALS compartments. The red ellipse in the center of PALS indicates the central artery lined by endothelium. The general FRC affiliation is depicted by blue, the regional variation by the second color (PALS: green, T/B border: yellow, referring to antigens shared between FRCs and FDCs; Fo/MS: red, for the antigens shared between endothelium and FRCs). Bold typesetting of various markers in the table insets at one region indicates stronger labeling compared to the intensity of reactivity at other micro-compartment of the same reagent. The subset-specific antibodies are listed on the right, corresponding to these regions; ER-TR-7 and IBL-7/22 (left) mAbs identify general FRC markers without subset-preference.

cytes, the expression of podoplanin is blocked; however, it remains inducible upon subsequent exposure to mature lymphocytes, even in adult RAG KO recipients and with LT-deficient donor cells. In contrast, in mice with LT deficiency, no such induction can be achieved by transferring LT-expressing inducer cells beyond the first postnatal weeks, despite the presence of mature lymphoid cells (Ngo et al., 2001). Thus in two subsequent events: (1) $LT\alpha/\beta_2$ ligand needs to be provided above a certain threshold level by LTi cells, in order to prime the stromal precursors for (2a) either successive non-LT-mediated developmental stimuli or (2b) preserve the responsiveness of immature FRCs if mature T/B cells are absent. As a general rule, the efficiency of these latter signals is modulated in a lymphoid tissue-specific manner, leading to different effects in lymph nodes or spleen. Such tissue-specific difference was noted with regard to the regulatory role of Nkx2.3 homeodomain-containing transcription factor, which promotes the formation of Peyer's patches and spleen vasculature (Pabst et al., 2000; Wang et al., 2000a,b; Balogh et al., 2007), but shows no apparent effect in lymph nodes (Pabst et al., 2000; Wang et al., 2000a,b). Similarly, B cells exerted differential effects in the induction of T-zone chemokines CCL19 and CCL21 by FRCs in spleen and lymph node (Ngo et al., 2001). In addition, the effect of CD30 expression on fine-tuning the T:B zone demarcation has also been demonstrated to be selective for the spleen, as the lymph nodes in CD30-deficient mice showed no structural alterations compared to normals (Bekiaris et al., 2007).

3.2. Redistribution and local specialization—relationship of FRCs with other stromal elements

Although in both humans and young adult mice the stromal components are considered static constituents within the lymphoid tissues, a substantial repositioning can be observed during their development. This process is accompanied with the simultaneous rearrangement of other "stromal" cells. These latter cells include sialoadhesin-positive (Sn/CD169) macrophages in both lymph nodes and spleen in neonates (Fisi et al., in preparation). Thus, fibroblastic reticular cells identifiable with IBL-11 appear to be clustering at the peripheral part of developing white pulp, while Sn-positive macrophages are recruited from the red pulp in a pertussis-toxin sensitive process. In this way a continuous tissue barrier is formed, positioned alongside these fibroblastic cells. Therefore the bulk of incoming flow (lymph in lymph nodes and blood in spleen, respectively) at both tissues is drained through a compartment formed together by FRCs and macrophages of similar phenotypic and, possibly, functional features.

The function of marginal sinus-lining cells (regardless of their as yet undefined ontogenic origin) is to maintain adhesion and homing of lymphocytes, mediated by mechanisms distinct from those in lymph nodes (Nolte et al., 2002). In addition, they are also involved in the retention of MZ B cells. This phenomenon by itself is mediated by diverse cells and mechanisms, such as adhesion to VCAM-1/ICAM-1 positive sinus-lining cells, or by MZ macrophages expressing MARCO glycoprotein (Lo et al., 2003; Karlsson et al., 2003). Furthermore, a delicate balance is maintained between sphingosine-1-receptor 1 ($S1P_1$) and CXCL13, a follicular homeostatic chemokine, for tissue positioning of MZ B cells (Cyster, 2005). In contrast to $S1P_1$, which acts in a lymphocyte-endogenous manner, the absence of $S1P_3$ in non-hemopoietic cells influences the distribution of stromal cells in the MZ, resulting in an enlarged rim of MAdCAM-1^+ mesenchymal cells (Girkontainte et al., 2004). To our knowledge this is the only mutation where the resulting phenotype includes an enlarged MAdCAM-1 positive region, as opposed to disturbances related to LT/RelB or Nkx2.3-mediated differentiation (Randall et al., 2008). Depending on the type of mutation, these mice are characterized by the absence of MAdCAM-1 expres-

dc_1678_19

sion in the MZ, or the emergence of ectopic vessels that co-express MAdCAM-1 and PNAd within the red pulp, with the simultaneous lack of MAdCAM-1 in MZ (Guo et al., 2007).

Findings in mice with $S1P_3$ deficiency also hinted at some hitherto unexpected relationship between the positioning of stromal elements of distinct origins, such as MZ macrophages and regional FRCs. In $S1P_3^{-/-}$ mice the enlarged MAdCAM-1-positive rim was associated with a disorganized distribution of Sn-positive MZ macrophages. To determine the relationship between the positioning of these two cell types, adoptive transfer experiments performed in $S1P_3^{-/-}$/$RAG^{-/-}$ double mutant mice (reconstituted with normal splenic B cells) revealed that the expansion of MAdCAM-1^+ cells preceded the alignment of Sn-positive MZ macrophages This sequence indicates that the path-setting function for the pairing of Sn^+ MZ macrophages and FRCs is more likely attributable to the MAdCAM-1^+ FRCs. Using RAG KO recipients and $S1P_3^{-/-}$ B cells normal distribution of MAdCAM-1^+ cells could be induced, thus their aberrant architecture in $S1P_3^{-/-}$ mice was not caused by $S1P_3^{-/-}$ B cells. This possible scenario with the primary role of MAdCAM-1^+ FRCs in guiding the positioning of Sn^+ macrophages (possibly upon the exposure to B cells; Nolte et al., 2004) is corroborated by the previous finding of normal stromal expression of MAdCAM-1 and BP-3 in op/op mice, despite the deficiency of MZ macrophages (Ngo et al., 2001). The underlying mechanism resulting in this co-localization is as yet unknown.

Both the period and tissue location when the MZ macrophage–FRC juxtaposition occurs corresponds to when the first identifiable precursors of FDCs as FDC-M1-positive cells appear at the same peripheral region of emerging white pulp (Balogh et al., 2001). These putative precursors for FDCs form a loose ring at the edge of white pulp. Subsequently, these cells gradually relocate into the follicles probably upon the engagement of p55 TNF receptor (Pasparakis et al., 2000), during which process they upregulate the expression of CD21/35 and, possibly, with the involvement of TRAF6 (Qin et al., 2007). Postnatal irradiation experiments also indicated that the stimulus for CD21/35 expression requires only a small amount of B cells (Balogh et al., 2001). Furthermore, it was observed that the lymphoid cells providing the necessary signals may be either immature B cells (formed locally or transitional stage cells from bone marrow) or B-1 B cells (Wen et al., 2005). It is not yet known whether the formation of follicular stroma during this postnatal period involves any communication between the FDC precursors and FRCs, with latter partners also being at an immature stage.

An inductive connection between mouse lymph node-derived FRCs and FDCs in the formation of FDC network has recently been observed by the *in vitro* effect of exposure to various ECM components on the adhesion and cellular regeneration of isolated FDCs (El Shikh et al., 2007). The culture of purified FDCs on plastic surfaces precoated with collagen Type I resulted in an enhanced adhesion of otherwise non-adherent FDCs to the surface of culture dishes, with the cells arranged in small clusters. In support for the ECM-adhesion, FDCs were found to express CD29, the β1 integrin subunit shared by collagen ($\alpha_{1,2,3,9,10,11}\beta_1$), laminin ($\alpha_6\beta_1$), and fibronectin ($\alpha_4\beta_1$) receptors, and the hyaluronic acid receptor CD44. In addition, the majority of FDCs that had lost their dendrites during the purification procedure could efficiently regenerate their processes to form an elaborate network of branched dendrites in prolonged cultures. These regenerated dendrites efficiently retained immune complexes, a highly specific function of FDCs *in vivo*. Interestingly, a characteristic follicular repositioning of FDCs relative to FRC-derived collagen type I was also observed during immune response, indicating a close *physical* connection, but also arguing against the ontogenic relatedness between FDCs and FRCs.

4. Future perspectives and conclusion

Despite the ubiquitous appearance of fibroblasts in mesodermal tissues, the FRCs in peripheral lymphoid tissues display a considerable degree of heterogeneity in cell surface characteristics and developmental properties. Although present only at low numbers in lymphoid organs, substantial progress has been made in understanding their functions in organizing the lymphoid tissues. Due to their extensive interactions with and influences upon lymphoid cells, their manipulation by either pathogens or medical interventions can significantly affect the individual's capacity to mount adaptive immune responses. Its preservation under normal conditions indicates the FRCs undergo a continuous renewal, where the differentiation process may involve interactions with other stromal cells as well as with mature lymphocytes. Further studies are necessary for exploring both the renewal and postnatal specialization of these cells in order to devise effective strategies for therapeutic intervention aimed at either restoring or suspending FRC functions.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Drs. Sanjiv A. Luther and David Withers for sharing their unpublished results on IBL-10 and IBL-11 mAb staining with other topographic markers and in various mutants with impaired stromal development. Péter Balogh is a recipient of the Öveges Postdoctoral Fellowship of the National Office for Research and Technology (NKTH), Hungary.

References

Allen, C.D., Cyster, J.G., 2008. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. Semin. Immunol. 20, 14–25.
Bajénoff, M., Egen, J., Koo, L., Laugier, J., Brau, F., Glaichenhaus, N., Germain, R., 2006. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. Immunity 25, 989–1001.
Balázs, M., Grama, L., Balogh, P., 1999. Detection of phenotypic heterogeneity within the murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies IBL-7/1 and IBL-7/22. Hybridoma 18, 177–182.
Balogh, P., Aydar, Y., Tew, J.G., Szakal, A.K., 2001. Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. Cell. Immunol. 214, 45–53.
Balogh, P., Horváth, G., Szakal, A.K., 2004. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. J. Histochem. Cytochem. 52, 1287–1298.
Balogh, P., Balázs, M., Czömpöly, T., Weih, D.S., Arnold, H.H., Weih, F., 2007. Distinct roles of lymphotoxin-beta signaling and the homeodomain transcription factor Nkx2.3 in the ontogeny of endothelial compartments in spleen. Cell Tissue Res. 328, 473–486.
Bekiaris, V., Withers, D., Glanville, S.H., McConnell, F.M., Parnell, S.M., Kim, M.Y., Gaspal, F.M., Jenkinson, E., Sweet, C., Anderson, G., Lane, P.J., 2007. Role of CD30 in B/T segregation in the spleen. J. Immunol. 179, 7535–7543.
Bofill, M., Akbar, A.N., Amlot, P.L., 2000. Follicular dendritic cells share a membrane-bound protein with fibroblasts. J. Pathol. 191, 217–226.
Borrello, M.A., Phipps, R.P., 1996. Differential Thy-1 expression by splenic fibroblasts defines functionally distinct subsets. Cell. Immunol. 173, 198–206.
Bovari, J., Czömpöly, T., Olasz, K., Arnold, H.H., Balogh, P., 2007. Complex organizational defects of fibroblast architecture in the mouse spleen with Nkx2.3 homeodomain deficiency. Pathol. Oncol. Res. 13, 227–235.
Crowley, M.T., Reilly, C.R., Lo, D., 1999. Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen. J. Immunol. 163, 4894–4900.
Cyster, J.G., 2005. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. Annu. Rev. Immunol. 23, 127–159.
Drayton, D.L., Liao, S., Mounzer, R.H., Ruddle, N.H., 2006. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. Nat. Immunol. 7, 344–353.
El Shikh, M.E., El Sayed, R.M., Tew, J.G., Szakal, A.K., 2007. Follicular dendritic cells stimulated by collagen type I develop dendrites and networks in vitro. Cell Tissue Res. 329, 81–89.
Farr, A.G., Berry, M.L., Kim, A., Nelson, A.J., Welch, M.P., Aruffo, A., 1992. Characterization and cloning of a novel glycoprotein expressed by stromal cells in T-dependent areas of peripheral lymphoid tissues. J. Exp. Med. 176, 1477–1482.

dc_1678_19

Girkontainte, I., Sakk, V., Wagner, M., Borggrefe, T., Tedford, K., Chun, J., Fischer, K.D., 2004. The sphingosine-1-phosphate (S1P) lysophospholipid receptor S1P3 regulates MAdCAM-1 + endothelial cells in splenic marginal sinus organization. J. Exp. Med. 200, 1491–1501.

Gonzalez, M., Mackay, F., Browning, J.L., Kosco-Vilbois, M.H., Noelle, R.J., 1998. The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. J. Exp. Med. 187, 997–1007.

Gretz, J.E., Kaldjian, E.P., Anderson, A.O., Shaw, S., 1996. Sophisticated strategies for information encounter in the lymph node: the reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic. J. Immunol. 157, 495–499.

Gretz, J.E., Anderson, A.O., Shaw, S., 1997. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. Immunol. Rev. 156, 11–24.

Guo, F., Weih, D., Meier, E., Weih, F., 2007. 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 110, 2381–2389.

Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Chaponnier, C., 2001. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. Mol. Biol. Cell 12, 2730–2741.

Hinz, B., Gabbiani, G., 2003. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. Curr. Opin. Biotechnol. 14, 538–546.

Kaldjian, E.P., Gretz, J.E., Anderson, A.O., Shi, Y., Shaw, S., 2001. Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix. Int. Immunol. 13, 1243–1253.

Katakai, T., Hara, T., Lee, J.H., Gonda, H., Sugai, M., Shimizu, A., 2004a. A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. Int. Immunol. 16, 1133–1142.

Katakai, T., Hara, T., Sugai, M., Gonda, H., Shimizu, A., 2004b. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. J. Exp. Med. 200, 783–795.

Kapasi, Z.F., Burton, G.F., Shultz, L.D., Tew, J.G., Szakal, A.K., 1993. Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. J. Immunol. 150, 2648–2658.

Karlsson, M.C., Guinamard, R., Bolland, S., Sankala, M., Steinman, R.M., Ravetch, J.V., 2003. Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. J. Exp. Med. 198, 333–340.

Kraal, G., Schornagel, K., Streeter, P.R., Holzmann, B., Butcher, E.C., 1995. Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen. Am. J. Pathol. 147, 763–771.

Luther, S.A., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G., Cyster, J.G., 2000. 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, 12694–12699.

Link, A., Vogt, T.K., Favre, S., Briotschgi, M.R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J.G., Luther, S.A., 2007. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. Nat. Immunol. 8, 1255–1265.

Lokmic, Z., Lämmermann, T., Sixt, M., Cardell, S., Hallmann, R., Sorokin, L., 2008. The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. Semin. Immunol. 20, 4–13.

Lo, C.G., Lu, T.T., Cyster, J.G., 2003. Integrin-dependence of lymphocyte entry into the splenic white pulp. J. Exp. Med. 197, 353–361.

Mebius, R.E., 2003. Organogenesis of lymphoid tissues. Nat. Rev. Immunol. 3, 292–303.

Mebius, R.E., Nolte, M.A., Kraal, G., 2004. Development and function of the splenic marginal zone. Crit. Rev. Immunol. 24, 449–464.

Mueller, S.N., Matloubian, M., Clemens, D.M., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Gangappa, S., Larsen, C.P., Ahmed, R., 2007. Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 15430–15435.

Ngo, V.N., Korner, H., Gunn, M.D., Schmidt, K.N., Riminton, D.S., Cooper, M.D., Browning, J.L., Sedgwick, J.D., Cyster, J.G., 1999. 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, 403–412.

Ngo, V.N., Cornall, R.J., Cyster, J.G., 2001. Splenic T zone development is B cell dependent. J. Exp. Med. 194, 1649–1660.

Nolte, M.A., Hamann, A., Kraal, G., Mebius, R.E., 2002. The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. Immunology 106, 299–307.

Nolte, M.A., Belien, J.A., Schadee-Eestermans, I., Jansen, W., Unger, W.W., van Rooijen, N., Kraal, G., Mebius, R.E., 2003. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. J. Exp. Med. 198, 505–512.

Nolte, M.A., Arens, R., Kraus, M., Van Oers, M.H., Kraal, G., Van Lier, R.A., Mebius, R.E, 2004. B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. J. Immunol. 172, 3620–3627.

Pabst, O., Forster, R., Lipp, M., Engel, H., Arnold, H.H., 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.

Pasparakis, M., Kousteni, S., Peschon, J., Kollias, G., 2000. Tumor necrosis factor and the p55TNF receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precursors into splenic follicles. Cell. Immunol. 201, 33–41.

Qin, J., Konno, H., Ohshima, D., Yanai, H., Motegi, H., Shimo, Y., Hirota, F., Matsumoto, M., Takaki, S., Inoue, J., Akiyama, T., 2007. Developmental stage-dependent collaboration between the TNF receptor-associated factor 6 and lymphotoxin pathways for B cell follicle organization in secondary lymphoid organs. J. Immunol. 179, 6799–6807.

Randall, T.D., Carragher, D.M., Rangel-Moreno, J., 2008. Development of secondary lymphoid organs. Annu. Rev. Immunol. 26, 627–650.

Scandella, E., Bolinger, B., Lattmann, E., Miller, S., Favre, S., Littman, D.R., Finke, D., Luther, S.A., Junt, T., Ludewig, B., 2008. Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. Nat. Immunol. 9, 667–675.

Schacht, V., Ramirez, M.I., Hong, Y.K., Hirakawa, S., Feng, D., Harvey, N., Williams, M., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F., Oliver, G., Detmar, M., 2003. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. EMBO J. 22, 3546–3556.

Smith, J.P., Kosco, M.H., Tew, J.G., Szakal, A.K., 1988. Thy-1 positive tingible body macrophages (TBM) in mouse lymph nodes. Anat. Rec. 222, 380–390.

Steiniger, B., Barth, P., Hellinger, A., 2001. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration? Am. J. Pathol. 159, 501–512.

Tanaka, H., Hataba, Y., Saito, S., Fukushima, O., Miyasaka, M., 1996. Phenotypic characteristics and significance of reticular meshwork surrounding splenic white pulp of mice. J. Electron Microsc. (Tokyo) 45, 407–416.

Tew, J.G., Wu, J., Qin, D., Helm, S., Burton, G.F., Szakal, A.K., 1997. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. Immunol. Rev. 156, 39–52.

Van Vliet, E., Melis, M., Foidart, J.M., Van Ewijk, W., 1986. Reticular fibroblasts in peripheral lymphoid organs identified by a monoclonal antibody. J. Histochem. Cytochem. 34, 883–890.

Wang, C.C., Biben, C., Robb, L., Nassir, F., Barnett, L., Davidson, N.O., Koentgen, F., Tarlinton, D., Harvey, R.P., 2000a. 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.

Wang, S.L., Kutsche, M., DiSCiullo, G., Schachner, M., Bogen, S.A., 2000b. Selective malformation of the splenic white pulp border in L1-deficient mice. J. Immunol. 165, 2465–2473.

Wen, L., Shinton, S.A., Hardy, R.R., Hayakawa, K., 2005. Association of B-1 B cells with follicular dendritic cells in spleen. J. Immunol. 174, 6918–6926.

Withers, D.R., Kim, M.Y., Bekiaris, V., Rossi, S.W., Jenkinson, W.E., Gaspal, F., McConnell, F., Caamano, J.H., Anderson, G., Lane, P.J., 2007. The role of lymphoid tissue inducer cells in splenic white pulp development. Eur. J. Immunol. 37, 3240–3245.

Worbs, T., Mempel, T.R., Bölter, J., von Andrian, U.H., Förster, R., 2007. CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. J. Exp. Med. 204, 489–495.

dc_1678_19

dc_1678_19

Cellular Immunology **212,** 126–137 (2001)
doi:10.1006/cimm.2001.1847, available online at http://www.idealibrary.com on IDEAL®

Phenotypic Identification and Development of Distinct Microvascular Compartments in the Postnatal Mouse Spleen

Mercedesz Balázs, Gábor Horváth,* László Grama,† and Péter Balogh[1]

*Department of Immunology and Biotechnology, *Department of Radiology, and †Department of Biophysics, University Medical School of Pécs, Pécs, Hungary*

Received June 12, 2001; accepted August 12, 2001

In this paper we report the development of the sinus network of mouse spleen during the first postnatal month as studied with a set of new rat monoclonal antibodies (mAbs) against mouse splenic endothelial cell subpopulations. One of the new mAbs (IBL-7/1) also stained B-cell lineage cells in the spleen shortly after the birth as confirmed by three-color flow cytometry. This B-cell staining in the primordial follicles vanished by the fourth postnatal week, so that the expression of IBL-7/1 antigen was restricted to the marginal sinus endothelium and some red pulp sinuses and a minor B-cell subset in the spleen, presumably distinct from the follicular B-cell compartment. The other mAb (IBL-9/2) selectively labeled the sinusoids of the deeper part of the red pulp, without any reactivity against hemopoietic cells. The IBL-9/2-reactive cells in newborns appeared as isolated elements throughout spleen, and during the segregation of white and red pulps they formed an extensive network in the red pulp outside the marginal zone. Double-labeling immunofluorescence revealed that most of these sinusoids also stained weakly with IBL-7/1 mAb, whereas the strongly IBL-7/1-positive vessels of this region were IBL-9/2 negative. Neither of these mAbs reacted with the central artery. The comparative phenotypic analysis of the various vascular segments indicates that the splenic sinusoids of the marginal zone and red pulp, respectively, are lined with a heterogeneous array of endothelium. For the precise identification, isolation, and characterization of the possible homing function of these endothelium subsets these region-specific mAbs may be of potential value. © 2001 Elsevier Science

Key Words: **mouse spleen; development; red pulp; sinus endothelium; phenotype.**

INTRODUCTION

The endothelium of blood vessels plays an important role in the control of a variety of dispersed as well as local systems of the organism: tissue homeostasis, coagulation and fibrinolysis, blood–tissue exchange, leukocyte activation and migration, and the architectural organization of tissues (1, 2). It has been found that the environmental influences affecting the endothelial cells have a profound effect on many stable phenotypic traits the endothelial cells possess at a given tissue location. These modifications may expand to such complex phenomena as the establishment of the blood–brain barrier or the appearance of morphology typical for high endothelium lining the postcapillary venules in lymph nodes (3–6). These effects are brought about by a variety of soluble factors and, in a bidirectional manner, these endothelial cells themselves are also a rich source for a variety of such mediators acting upon leukocytes (7–10). These dynamic interactions are thought to result in a considerable degree of heterogeneity among the endothelial cells, which has been revealed in different species (11–14).

An important form of leukocyte–endothelium interactions is implicated during leukocyte extravasation and the lymphocyte homing processes across small-sized capillaries and postcapillary venules into the secondary lymphoid organs (15). While many components of the above adhesion- and migration-related events have already been identified in lymph nodes and Peyer's patches, the complex vascular architecture of the spleen has considerably hampered the understanding of how these interactions take place in that organ (16–19). According to the results obtained with microcorrosion casts, the overwhelming majority of flow passes through the marginal sinus bordering the white pulp, and only a small fraction of inflow is believed to drain through the red pulp sinusoids (20). A very important phenotypic marker (yet of unknown local significance) for the endothelium of this region is the MadCAM-1 protein (21), whose appearance was critical for the subsequent lymphoid organogenesis in embryos

[1] Address reprint requests to Péter Balogh at present address: Department of Anatomy, Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, P.O. Box 980709, Richmond, Virginia 23298. E-mail: pbalogh@hsc.vcu.edu.

0008-8749/01 $35.00
© 2001 Elsevier Science
All rights reserved.

dc_1678_19

(22, 23). Despite the marked expression of this $\alpha 4\beta 7$ integrin receptor/ligand on the marginal sinus endothelium, the administration of a blocking antibody in adults did not result in an impaired splenic homing of adoptively transferred lymphocytes. The failure of this mAb to interfere with the splenic positioning of lymphocytes indicates the involvement of other, still unidentified, adhesion molecules in the process (21, 24). The final arrangement of lymphocytes within the splenic microenvironment in adult mice is controlled by local chemotactic factors, most notably by BLC, DC-CK1, SLC, ELC, and ABCD-1 (16, 25, 26). Nevertheless, the initial events of lymphocyte extravasation during splenic homing and the endothelial components involved still remain very much debated. In contrast to the lymph nodes and Peyer's patches, L-selectin and the $\alpha 4\beta 7$ integrin seem to play only a minor role in attaching the recirculating lymphocytes to their as yet unidentified exit ports within the spleen (28–30).

Various studies examining the organization of splenic tissue have revealed the remarkable phenotypic and developmental heterogeneity of stromal elements, composed of various mesenchymal reticular cells, macrophages, and dendritic cells (31–33). This complexity is reflected not only in the unique phenotype of several of these sessile elements, but also in their divergent developmental pathways during primary differentiation as well as their repopulation kinetics following depletion (34). Also, there are data indicating the existence of differences between the endothelia of splenic sinusoids in both normal and malignant states (35). The involvement and role of these distinct sinus endothelial compartments as potential exit sites for recirculating lymphocytes have remained disputed. Therefore reagents distinguishing between various splenic vascular elements in experimental animals would be of potential help for the identification and further studies of the endothelial participants during the early phase of homing.

In this work we describe the heterogeneous composition of the endothelial lining within the sinusoidal microvascular system of the red pulp of mouse spleen, as delineated by using a combination of new rat monoclonal antibodies. According to our finding, the red pulp sinusoids in different locations (at the border region to the white pulp and in the deeper regions of the red pulp, respectively) are distinguishable according to their membrane antigen expression. This phenotypic heterogeneity of endothelial cells was utilized to define the establishment of distinct red pulp splenic sinusoidal components in the postnatal spleen.

MATERIALS AND METHODS

Animals. BALB/c mice and Wistar rats were obtained from the University's SPF Animal Breeding Unit and after their purchase they were maintained under conventional conditions. Procedures involving animals were conducted in accordance with the University's guidelines compliant with national and international laws and recommendations.

Production of IBL-9/2 monoclonal antibody. The spleens of 6-week-old irradiated BALB/c mice were removed from CO_2-asphyxed animals and were teased apart using a pair of watchmaker's forceps. The remaining fibrous stroma was used for immunizing 8-week-old female Wistar rats intraperitoneally. The rats were immunized three times, using the splenic stromal equivalent of four mice as antigen in each case. Three days after the last challenge cell fusion with polyethylene glycol was carried out according to the standard hybridoma procedure (36) using Sp-2/0 Ag14 cells as fusion partner. The resulting hybrid clones were tested for antibody production employing a large-scale immunohistochemical approach described previously (37), followed by limiting dilution cloning of the positive clones. The isotype of IBL-9/2 mAb was determined by sandwich ELISA using heavy chain isotype-specific mouse mAbs as capture antibodies (BD Pharmingen), followed by the addition of IBL-9/2 IgG purified on a protein G column (Sigma Aldrich). The binding was detected using biotinylated mouse anti-rat κ chain mAb MRC OX12 (generously provided by Dr. Don Mason, MRC Cellular Immunology Unit, Oxford, UK), followed by adding streptavidin–HRPO conjugate. The reaction was visualized with *o*-phenylenediamine in citrate buffer containing H_2O_2 as recommended by the supplier (Sigma Aldrich) and was measured at 492 nm.

Antibodies and other reagents. The distribution of lymphoid subsets was determined using the following monoclonal antibodies against mouse lymphocyte cell surface antigens: FITC-conjugated anti-mouse CD45 [clone IBL-5/25, produced in our lab (38)], FITC-labeled anti-B220, PE-Cy5-B220 (RA3-6B2), PE-Mac-1 (M1/70), Ter119, CD43 (S7), c-*kit* (ACK45), IgM (R6-60.2), IgD (11-26c.2a), and CD3 (17A2) and FITC-CD23 (B3B4) antibodies (BD Pharmingen). The PE-conjugated CD21 (7G6) was a kind gift from Dr. John F. Kearney (University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL). A pan-endothelial and marginal zone sinus endothelial membrane antigen was detected using unlabeled or biotinylated IBL-7/22 and IBL-7/1 mAbs, respectively (37), and as a reference, anti-CD31 (MEC13.3 from BD Pharmingen). During the hybridoma testing the rat immunoglobulins were detected using biotinylated MRC OX12 mouse anti-rat κ chain mAb and streptavidin-biotinylated HRPO complex (Amersham Pharmacia Biotech) or with a streptavidin–allophycocyanin conjugate (BD Pharmingen). The anti-endothelial antibodies were purified from tissue culture supernatant using protein G affinity chromatography by FPLC and labeled with either biotin–

dc_1678_19

N-hydrosuccinimide ester or fluorescein isothiocyanate (39).

Immunohistochemistry and immunofluorescence. The 7-μm cryostat sections prepared from tissues frozen in liquid N_2 were acetone-fixed and air-dried. Briefly, the sections were rehydrated with PBS containing dinitrophenylhydrazine at 1 mg/ml for 20 min to block the endogenous peroxidase activity. After rinsing, the specimens were blocked with 5% BSA in PBS and then they were incubated in hybridoma supernatants. After 45 min of incubation, the specimens were washed and further incubated with biotinylated OX12 mAb. The reaction was developed with streptavidin-biotinylated HRPO and visualized using *N*-aminoethylcarbasole and H_2O_2 in a 0.1 M Na-acetate buffer, pH 5.2. As a reference, a mouse CD31-specific mAb (BD Pharmingen) was also used. For double immunofluorescence, the sections blocked with BSA were incubated with a cocktail of FITC-labeled IBL-7/1 and biotinylated IBL-9/2 or anti-IgM mAbs for 45 min, followed by thorough rinsing in PBS. The biotinylated mAbs were detected using a streptavidin–phycoerythrin conjugate. For double staining with the splenic macrophage subsets the sections blocked with BSA were stained either with MOMA-1 or ERTR-9 hybridoma supernatants (both antibodies from the courtesy of Dr. Georg Kraal were generously provided to us by Dr. John F. Kearney, University of Alabama at Birmingham). After incubation with biotinylated anti-rat Ig the free binding sites of the anti-rat Ab were blocked with normal rat serum. The specimens were incubated with a cocktail of streptavidin–phycoerythrin conjugate and FITC-IBL-7/1 or FITC-IBL-7/22 or FITC-IBL-9/2 mAbs. The sections were mounted in 50% glycerol and analyzed with a Bio–Rad MRC1024 confocal microscope equipped with an argon-ion laser.

Flow cytometry. The single-color staining of newborn and young spleen, lymph node, thymus, and bone marrow was performed using hybridoma supernatants as first layer antibody, followed by incubating in FITC-conjugated OX12 IgG. The three-color labeling was carried out using a cocktail of FITC-conjugated anti-B220, biotinylated anti-endothelium mAbs, and phycoerythrin-conjugated mAbs against mouse IgM, IgD, CD3, CD43, Ter119, c-*kit*, or Mac-1 molecules, respectively, where the biotinylated mAbs were detected using a streptavidin–allophycocyanin conjugate, in the presence of 2.4G2 antibody blocking the Fcγ receptor (BD Pharmingen). After staining, the cells were resuspended in PBS containing 2 μg/ml of propidium iodide and analyzed using a Becton–Dickinson FACSCalibur and the CellQuest software. The incubations were carried out on ice for 30 min, and the excess reagents were washed out with repeated washing in PBS containing 0.1% Na-azide and BSA. For the demonstration of data, the results were interpreted using the WinMDI 2.8 software.

In vivo staining, perfusion, and laser confocal microscopic analysis. For *in vivo* binding, the purified IBL-9/2 mAb was labeled with FITC (the F/P conjugation degree was 3.8 as determined by photometry), of which conjugate 50 μg of IgG equivalent in 400 μl of 50% normal rat serum was injected intravenously. Twenty minutes later the mice were anesthetized with ketaminum (Calypsol, Richter Gedeon, Budapest, Hungary) and were perfused through the left ventricle with 50 ml of PBS, followed by 50 ml of 4% buffered paraformaldehyde, at the delivery rate of 10 ml/min. Previously we found that a similar labeling procedure with IBL-7/1 mAb resulted in a strong staining of the marginal sinus endothelium. The spleens were removed and vibratome sections of approximately 150 μm thickness were cut. Spatial projections of the recorded optical sections (3 μm each) were obtained with a Bio–Rad MRC1024 confocal microscope using LaserSharp 3.1 software.

RESULTS

Staining Pattern of Red Pulp Sinusoids with IBL-9/2 mAb

The IBL-9/2 antibody (isotype IgG2a/κ) displayed a selective reactivity against a subset of endothelium lining the red pulp sinusoid. There was no staining of either the central artery or the marginal sinus (Fig. 1A). To determine whether the epitope is expressed on the luminal structure of these vessels, an *in vivo* labeling was performed. After a short (15 min) incubation period following the intravenous injection of FITC-labeled antibody into mice, a strong membrane fluorescence confined to the sinusoids in the red pulp area could be observed using confocal microscopy, indicating that the antigen was exposed on the luminal surface of the endothelium (Fig. 1B).

The distribution of antigen recognized by IBL-9/2 mAb was tested on the same panel of tissues as our previously described antibodies (37) by immunohistochemistry employing a high-sensitivity avidin–biotin amplification system. The tissue samples included peripheral lymph nodes, thymus, brain, heart muscle, skeletal muscle, lungs, liver, kidney, urinary bladder, stomach, intestine, testicle, ovary, uterus, and skin. With the exception of a weak arteriolar staining in the glomeruli, there was no specific immunohistological staining exceeding that of the negative control sample, using normal rat IgG at 10 μg/ml (data not shown).

To define the regional reactivity of the endothelium-specific antibodies in the spleen in conjunction with topographically well-defined splenic macrophage subset-specific antibodies, we performed a set of double immunofluorescent stainings with IBL-7/1 or IBL-7/22

dc_1678_19

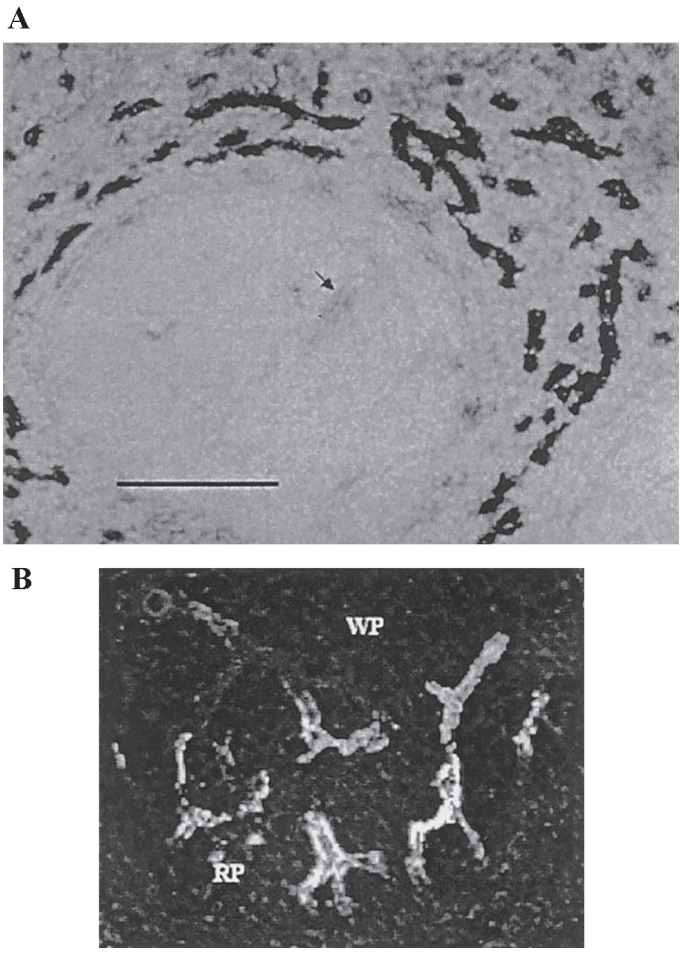


FIG. 1. (A) Staining of red pulp sinusoids with IBL-9/2 mAb in cryostat section. A white pulp part surrounded by red pulp containing IBL-9/2-positive vessels is shown, with an arrow pointing at the central artery within the white pulp (bar, 100 μm). (B) Luminal expression of epitope recognized by IBL-9/2 mAb. After intravenous injection with FITC-conjugated IBL-9/2 mAb, the recipient was perfused with paraformaldehyde and observed under confocal laser microscopy (original magnification, ×60) WP, white pulp; RP, red pulp.

or IBL-9/2 mAbs and MOMA-1 or ERTR-9 clones (Fig. 2). MOMA-1 recognizes a distinct subpopulation of macrophages (metallophilic macrophages) located in a ring around the follicles of the white pulp. These cells at the inner side of the marginal sinus form the anatomical border between the follicles and the marginal zone (57). The ERTR-9 antigen is expressed on marginal zone macrophages of the spleen, which are positioned distally (toward the red pulp) to both the metallophilic macrophages and the marginal sinus (58). The marginal sinus component of the endothelium labeled with IBL-7/1 and 7/22 mAbs is in close vicinity to the metallophilic macrophages (Figs. 2B and 2D), while the marginal zone macrophages are located distally (Figs. 2A and 2C). In contrast, since the reactivity of IBL-9/2 is restricted to the red pulp endothelium, neither of these macrophage subsets have intimate association with them (Figs. 2E and 2F). Using biotin-amplified immunofluorescence we could not detect any noticeable reactivity of IBL-9/2 to the central artery; therefore, the weak signal sometimes observed with immunohistochemistry may be due to other factors than immunological recognition of the epitope by the rat mAb.

The Mouse Spleen Red Pulp Sinuses Are Lined by at least Two Different Types of Endothelium

We have already reported the differential staining of the splenic central artery and the marginal sinus endothelium with two previous monoclonal antibodies (37). Of these antibodies, the IBL-7/1 (in addition to its strong marginal sinus reactivity) also stained the red pulp sinuses in a heterogeneous pattern. Some of the red pulp sinuses stained rather strongly, whereas another set of sinuses was much less intensely labeled. The selective labeling of red pulp sinusoids by the IBL-9/2 mAb now offered the possibility of analyzing the phenotype of the splenic red pulp endothelial subcompartments in more detail. Double-labeling fluorescent staining using FITC-conjugated mAb IBL-7/1 and biotinylated IBL-9/2 in conjunction with PE revealed that there are at least two different types of endothelium in close vicinity to each other within the red pulp (Fig. 3). In the region outside the marginal sinus (defined by its strong reactivity with IBL-7/1 mAb) two phenotypically distinct endothelial cell populations could be identified: the IBL-7/1^{high} (nonmarginal sinus) vessels were IBL-9/2-negative, whereas the IBL-7/1^{low} sinuses were intensely stained with IBL-9/2 mAb. The anti-CD31 mAb, which reacted rather strongly with the endothelium of the central artery, gave only very weak staining with either of these vessels (not shown), as reported previously (53). Taking into account the distinct tissue locations combined with their phenotypic properties, it seems that there are at least four types of splenic vascular structures lined with different endothelia, as listed in Table 1.

Development of Marginal Sinus in Neonatal Mice

The development of vascular architecture was investigated by the immunohistochemical analysis of spleen during the first month after birth. The panel of antibodies included two mAbs against two splenic sinus endothelium subsets (IBL-7/1 and IBL-9/2), a pan-endothelium and T-cell zone/red pulp reticulum-specific mAb (IBL-7/22), reported by Balázs *et al.* (37), and a CD31-specific mAb as reference, respectively. The immunohistochemical findings of this process are summarized in the Figs. 4A–4L.

In neonatal mice (less than 12 h old) all the vascular structures (the central artery, marginal sinus, and various red pulp sinuses, respectively) stained by the

dc_1678_19

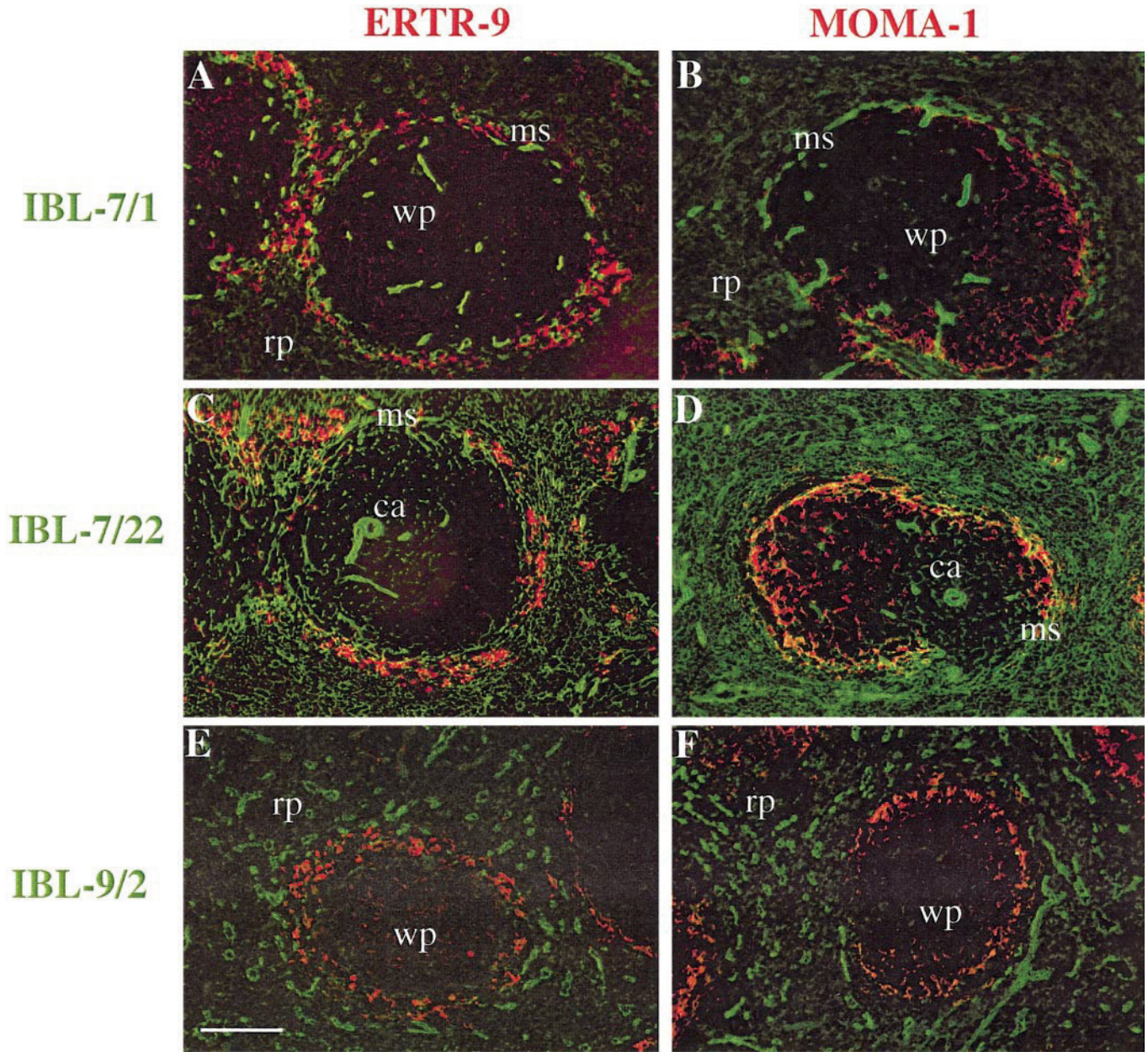


FIG. 2. Relationship between mouse splenic macrophage subsets and splenic endothelium. Two-color immunofluorescent labeling shows the reactivity of IBL-7/1 (A and B), IBL-7/22 (C and D), and IBL-9/2 (E and F) mAbs (green) in conjunction with the marginal metallophilic macrophages (clone MOMA-1, red, B, D, and F) and marginal zone macrophages (clone ERTR-9, red, A, C, and E) (ms, marginal sinus; ca, central arteriole; rp, red pulp; wp, white pulp) (bar, 100 μm).

three different mAbs in adult mice were already present, even though their distribution was considerably different from those in the adult. The staining pattern of spleen sections at this early stage revealed only rudimentarily organized vascular structure.

The pan-endothelial antigen reactive with IBL-7/22 (which epitope was also expressed by some reticular components of the T-cell zone and red pulp, respectively) revealed a slight compartmentalization of and around the central artery.

At this stage, the IBL-7/1 staining was confined to some elongated cells in the peripheral part of the developing white pulp, which sometimes had a branched or dendritic morphology. In addition to this staining, some intensely stained lymphocytes could also be observed, more prominently in the white pulp. The IBL-9/2-positive elements appeared as dispersed cells with various morphologies throughout the spleen, with no evidence of network formation (Figs. 4A–4C).

dc_1678_19

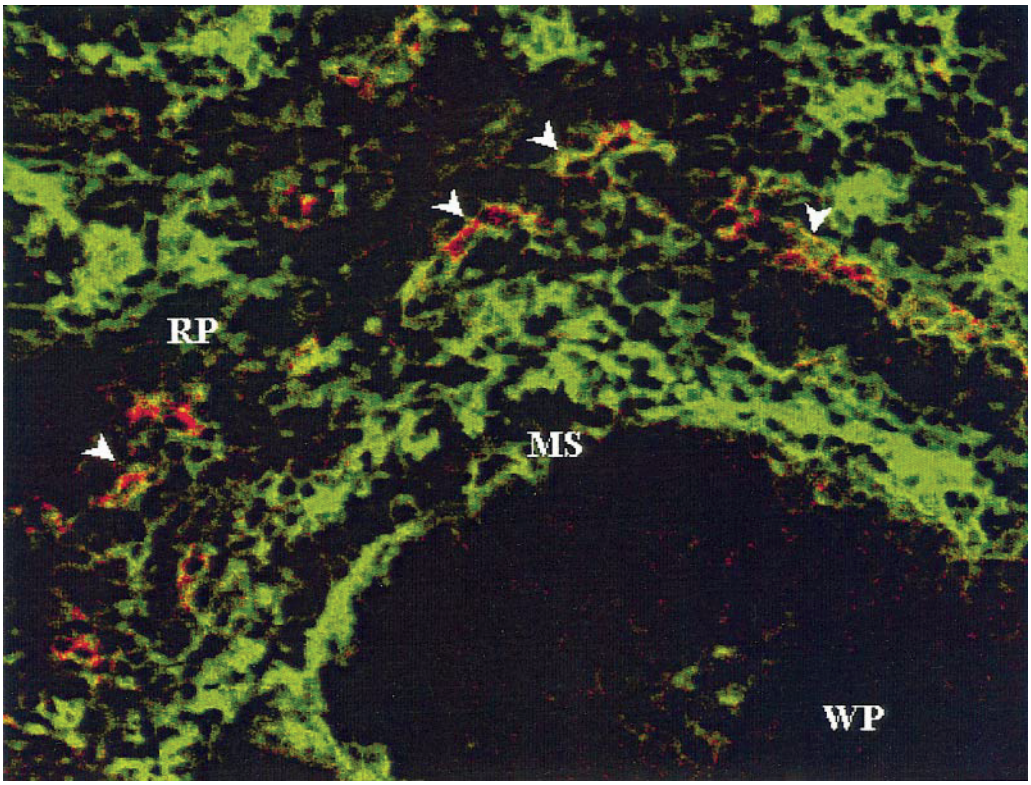


FIG. 3. Two-color immunofluorescent staining of splenic sinusoids with IBL-7/1 (green) and IBL-9/2 (red). The sinusoids labeled weakly with IBL-7/1 mAb coexpress the IBL-9/2 determinant (arrowheads), whereas the marginal sinus and the red pulp sinusoids are strongly positive with IBL-7/1 mAb and do not express the IBL-9/2 antigen (original magnification, ×60) (RP, red pulp; MS, marginal sinus; WP, white pulp).

At 1 week of age, the reticular compartmentalization within the white pulp and the segregation of white pulp and red pulp vasculature, respectively, reached a substantial degree. The region surrounding the central artery was distinguished by its considerably denser reticular meshwork, whereas the follicular regions (as identified by the appearance of B-cell clusters) stained much more weakly with IBL-7/22 mAb. The marginal sinus appeared to have developed into a region of interconnected endothelial cells, which were labeled strongly with IBL-7/1 mAb. However, the marginal sinus was still not continuous at this stage, which was manifested as large gaps in the IBL-7/1 mAb binding in that area. Substantial lymphocyte staining with this mAb could be noticed (see below). The IBL-9/2-positive elongated cells in the red pulp started to form connections, resulting in a network-like assembly (Figs. 4D–4F).

TABLE 1
Phenotypic Heterogeneity of Different Vascular Beds in the Mouse Spleen

	Membrane antigen phenotype		
Region	IBL-7/1	IBL-9/2	CD31
Central arteriole	−	−	++
Marginal sinus	++	−	+
Red pulp sinus I	++	−	+/−
Red pulp sinus II	+	++	+/−

Note. The symbols indicate the staining intensity of the various compartments observed with immunofluorescence.

By the age of 3 weeks, the adult-type vascular architecture was established. The marginal sinus appeared as a nearly continuous region, separating the inner parts of the white pulp from the marginal zone. Parallel to this, the white pulp itself has been compartmentalized into a periarteriolar lymphoid sheath and follicles, the latter almost completely lacking the reticular components recognized by IBL-7/22 mAb. By this time there was only a faint IBL-7/1 staining of the white pulp lymphocytes (see below). The IBL-9/2-positive red pulp vessels formed an extended network outside the marginal zone, with frequent branching (Figs. 4G–4I). This arrangement corresponded to the adult-type pattern (Figs. 4J–4L). It appears that the establishment of various vascular beds in the splenic red pulp follows a similar temporal course and proceeds simultaneously with the compartmentalization of the white pulp, even though the IBL-7/1-positive marginal sinus was still

dc_1678_19

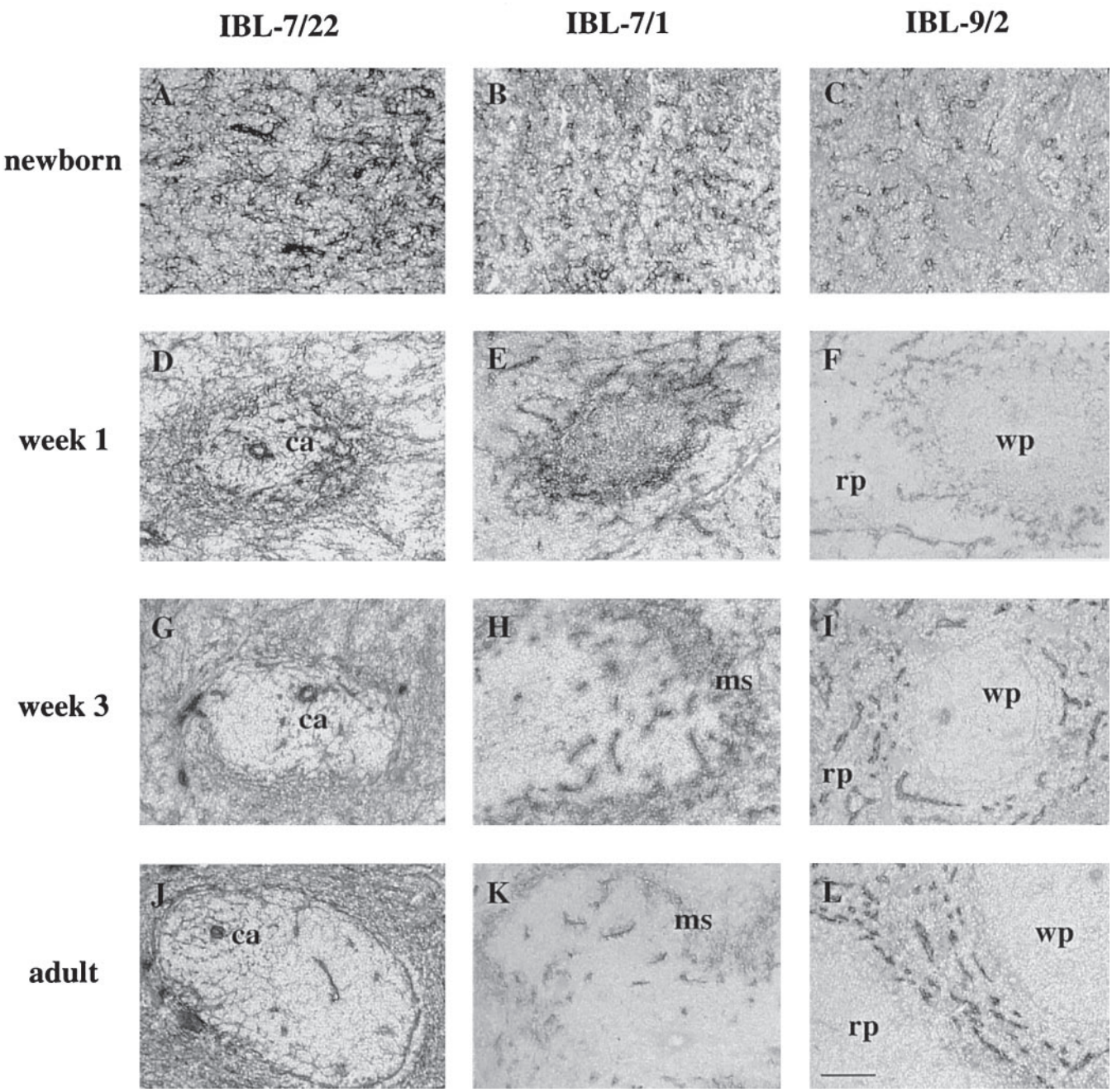


FIG. 4. Organization of marginal sinus and splenic vasculature during the early postnatal life. Cryostat sections were prepared from newborn (A–C), 1-week (D–F)- and 3-week (G–I)-old animals, and adult controls (J–L) and stained with mAbs as indicated at the top. Bar, 100 μm.

not as complete (compared to adult) at this stage as the network formation by IBL-9/2-positive vessels.

IBL-7/1: A Marginal Sinus Endothelium Antigen Transiently Expressed by Neonatal Splenic B Cells and Erythroid Cells

Our observation indicating the appearance of the antigen recognized by IBL-7/1 mAb on lymphoid cells in neonates as detected by immunohistochemistry was in slight contrast to our previous findings, in which the adult splenic lymphocytes did not express this structure at a significant level (37). The subsequent flow cytometric analysis showed that, in addition to the marginal sinus endothelium, a substantial fraction of hematopoietic cells also expressed the IBL-7/1 antigen in the neonatal spleen (Fig. 5).

The IBL-7/1 antigen was present on cells of both the B and the erythroid lineage, as defined by the surface

dc_1678_19

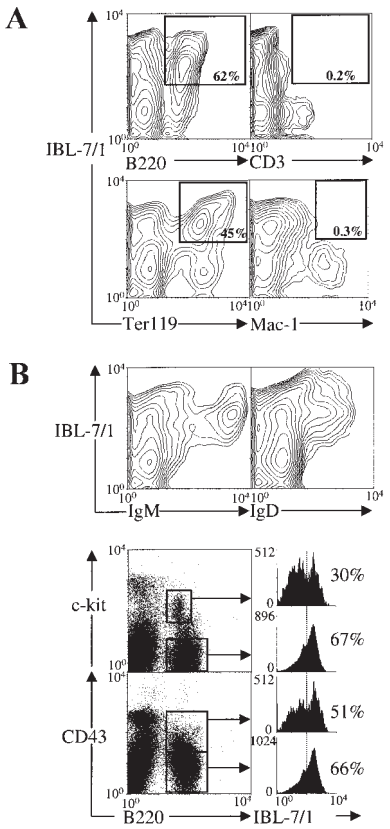


FIG. 5. Flow cytometric analysis of the expression of a marginal zone sinus endothelium antigen by lymphocytes in neonates on spleen day 1. (A) The expression of IBL-7/1 antigen by B cells (top left) and erythroid cells (bottom left), as identified by the coexpression of B220 and Ter119 lineage-restricted surface molecules. T cells (CD3 positive) and Mac-1 macrophages do not display the IBL-7/1 antigen (top right and bottom right). The numbers in the analysis gate rectangle represent the percentage of double positive cells within the various hemopoietic cell populations as identified by their lineage marker expression, representative of three independent analyses. (B) IBL-7/1 phenotype of various splenic B-cell subpopulations and precursors in neonatal spleen. The majority of mature B cells (identified by their expression of IgM or IgD) display the IBL-7/1 epitope (top two panels). The various immature precursors have different IBL-7/1 expression profiles. The histograms illustrate the IBL-7/1 staining pattern of selected cell subpopulations based on their cell surface coexpression of B220 and c-*kit* or B220 and CD43 antigens, respectively. The numbers correspond to the frequency of the IBL-7/1-positive fraction within each gated cell subset, as the number of events exceeding that of the negative control (represented as vertical dotted line).

expression of the high-molecular-weight CD45R isoform (B220) and Ter119 antigens, but absent from neonatal T cells and on monocytoid lineage cells, identified as CD3- and Mac-1-positive cells, respectively. (Fig. 5A). Within the B lineage, all the surface Ig-bearing (including the IgM- and IgD-positive) cells seemed to express the IBL-7/1 antigen. According to the appearance of the early maturation-related markers c-*kit* and CD43 on B-cell precursors, we assume that the antigen appears on the transition between the pro/pre-B stages in neonates (Fig. 5B), at a period when the newborn spleen still functions as a primary B-lymphopoietic organ, rather than a peripheral lymphoid tissue.

Expression of IBL-7/1 Antigen on Adult Splenic Marginal Zone B Cells and Bone Marrow Erythroid Cells

In the adult spleen, only a small fraction of the B cells preserved their IBL-7/1 reactivity, while the overwhelming majority of the B220-positive cells did not express this antigen. It was interesting to determine whether the preservation of the IBL-7/1 antigen correlates with their cell surface Ig isotype pattern. We found that the IBL-7/1-negative B lymphocytes displayed the IgM^{lo}/IgD^{hi} phenotype, whereas the IBL-7/1-positive B cells were IgM^{hi}/IgD^{lo}, suggesting that they possibly formed two different splenic B-cell subsets. The differential expression of the membrane Ig isotype may correlate with the follicular or marginal zone location of the B cells, which prompted us to extend the phenotypic comparison for markers discriminating between the follicular and marginal zone B subsets, such as CD21 and CD23 (54–56). According to our observations, IBL-7/1-positive B cells were found to exhibit the phenotype of the nonrecirculating marginal zone B-cell subset ($CD23^{low}/CD21^{hi}$). Moreover, IBL-7/1-positive cells were larger, consistent with their marginal zone phenotype (Fig. 6A). In contrast, IBL-7/1-negative B cells displayed the $CD23^{hi}/CD21^{low}$ phenotype which, combined with their IgM^{lo}/IgD^{hi} isotype pattern, strongly suggests that these latter cells (the majority of the total splenic B-cell pool) correspond to the follicular B-cell compartment.

In the adult bone marrow the majority of erythroid lineage cells maintained their IBL-7/1 reactivity even by the age of 6–8 weeks. In contrast to the extent of expression detected at certain stages of primary B-cell development in the neonatal spleen, less than 10% of the medullary B lineage cells were IBL-7/1 positive (Fig. 6B). Summarizing the data of the phenotypic analysis we have concluded that the IBL-7/1 antigen (in addition to its endothelial and erythroid appearance) is (transiently) expressed at certain stages of primary B-cell development in neonatal spleen to a large extent, but only marginally in adult bone marrow. In the adult spleen, however, its appearance may correlate with the marginal zone characteristics of B cells. Despite our repeated attempts using alternative protocols, however, we could not obtain detectable material either by the Western blot of detergent extracts of splenic stroma or by immunoprecipitating newborn splenic B cells. We believe that these unsuccessful attempts may reflect on either the relatively low number of antigenic determinants on B cells (as evident both from *in situ* staining and flow cytometry) or its sensi-

dc_1678_19

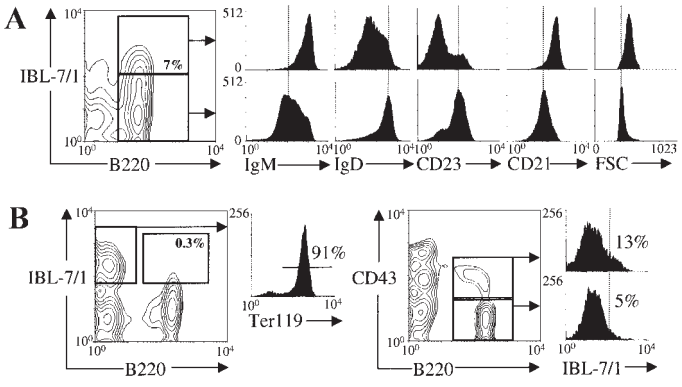


FIG. 6. Membrane antigen expression and surface Ig phenotype of IBL-7/1-positive cells in adult spleen (A) and bone marrow (B). (A) Comparison of IBL-7/1-positive and -negative B cells (top and bottom rectangles in the contour graph and top and bottom rows of derived histograms, respectively) reveals a considerable difference in the expression level of membrane Ig isotypes (IgM/IgD), CD23 and CD21 molecules, and cell size (labeled as FSC). With the exception of FSC, the other parameters were plotted on a logarithmic scale. (B) Preservation of IBL-7/1 antigen by adult bone marrow-derived cells. The majority of IBL-7/1-positive cells are B220 negative (lefthand square in the top contour graph), and most of these cells coexpress the Ter119 erythroid antigen (top histogram). The B lineage cells are overwhelmingly negative, even though both the less mature CD43/B220 double positive (top region in the bottom contour graph) and more differentiated CD43-negative/B220-positive (bottom region in the bottom contour graph) subsets contain a small IBL-7/1-positive fraction, as shown by their frequency values in the histograms on the right.

tivity to the denaturation processes occurring during the Western blot procedure of the extracted stroma.

DISCUSSION

The spleen represents a unique organ of major immunological importance, in which the lymphoid and hemopoietic regions are arranged essentially around its vasculature. In contrast to the vast amount of data concerning the phenotypic and developmental heterogeneity of its lymphoid and myeloid (macrophages and dendritic) cell subsets, its complex vascular architecture has only partially been revealed in terms of the molecular and cellular characteristics of endothelial cells. The present paper adds a new set of data pertaining to the emerging concept of endothelial cell heterogeneity, presumably reflecting their regional functional specialization.

With the use of antibodies specific for various endothelium subsets we found that, in addition to the selective labeling of marginal sinus endothelium by the IBL-7/1 mAb in adult mice, there was a further heterogeneity of vascular labeling with this mAb within the red pulp. Some of the red pulp sinusoids displayed the same level of reactivity as the marginal sinus, whereas another set of sinuses stained much more weakly. The selective labeling of this latter subset of red pulp sinus endothelium with IBL-9/2 mAb confirmed the phenotypic differences among the endothelial linings of these segments of sinusoidal vasculature as noted above. This complex phenotype parallels the functional importance of red pulp sinusoids in producing CXCL16, a molecule which may regulate local migration of CD8 T cells (50). It was interesting to observe that by the time of birth, these endothelial compartments of marginal sinus and various red pulp sinuses, respectively, were already present in the spleen, although in a rudimentary form. Nevertheless, their overall distribution in neonates corresponded to that in adulthood. This finding indicates that splenic endothelial maturation and phenotypic diversification substantially progressed during intrauterine angiogenesis. It appeared that the adult-type distribution of both the IBL-9/2-positive/IBL-7/1^{lo} and IBL-9/2-negative/IBL-7/1^{high} red pulp vascular elements was completed somewhat earlier (around the first postnatal week) than the establishment of the continuous (IBL-7/1-positive) marginal sinus. We hypothesize that the emergence of the latter structure may to some extent depend on proper lymphoid colonization and segregation within the white pulp it surrounds, as evidenced by the lack of MadCAM-1 expression by the marginal sinus in *aly* mice (51) or in RAG-1-deficient mice (59). In our preliminary studies on SCID mice we did not detect any striking difference in the labeling patterns of these new mAbs compared to those of normal mice, indicating that the appearance of these structures is independent of mature T and B cells.

We concluded that, in addition to the differences between the continuous (central artery type) and discontinuous (sinusoidal type) endothelium, there are at least three distinct vascular subsets within the red pulp and marginal zone, according to their phenotype and tissue location. The observations obtained with the MS-1 mAb against human sinusoidal endothelium (40) show a strikingly similar staining of normal spleen to that of IBL-9/2. A notable difference is, however, that the antigenic determinant recognized by MS-1 mAb is also expressed on many other sinus endothelia from tissues other than the spleen and is also displayed by dendritic cells, whereas the tissue reactivity of IBL-9/2 mAb is much more restricted. A further clue for the existence of possible distinct endothelial subsets was provided by the phenotypic analysis of splenic vascular tumors of sinus-lining (littoral) cell origin that has confirmed their distinct CD31$^+$, CD34$^-$, CD68$^+$, and CD21$^+$ phenotypes (35). Several of these membrane antigens are shared with mononuclear phagocytes as well as dendritic cell subsets, indicating some developmental relationship between the two lineages (41–44). The simultaneous expression of IBL-7/1 antigen on neonatal B cells and splenic erythroid progenitors as well as developing marginal sinus endothelium may also point to the developmental relationship between

dc_1678_19

the endothelium and hemopoietic cells (45). This coexpression was transient for splenic B cells and has been reduced to only a small fraction of the total B-cell pool at around the fourth postnatal week. Taking into account the characteristics of the IBL-7/1-postive population (IgM^{hi}/IgD^{low}, $CD21^{hi}/CD23^{low}$, large, B220-positive lymphocytes), we believe that the IBL-7/1 antibody labels the splenic marginal zone B-cell subset in the adult spleen (52, 54–56). In a contrast to this transient expression pattern in the spleen, in adult animals the IBL-7/1 antigen was preserved on bone marrow-derived erythroid progenitors. It appears that while the appearance of IBL-7/1 antigen on hemopoietic cells in the spleen follows a lineage and temporally restricted expression pattern, in the bone marrow it remains lineage-restricted. Further studies on the hemopoietic or endothelial differentiation pathways of the recently identified putative hemangioblasts will certainly provide important data for understanding the developmental aspects of endothelial heterogeneity (46–49). We suggest that for further studies of the structural, developmental, and functional differences between the endothelial subsets, and for their identification and eventual separation, these new mAbs will also prove useful tools.

ACKNOWLEDGMENTS

The MRC OX12 hybridoma cell line was generously provided by Dr. Don Mason and Mike Puklavec (MRC Cellular Immunology Unit, Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford). The authors thank for Dr. John F. Kearney (Division of Clinical and Experimental Immunology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL) providing the PE-CD21 and other mAbs. The hybridoma testing was assisted by the kind contribution of Ms. Judit Melczer. The authors gratefully acknowledge the helpful critical comments of Dr. Andras K. Szakal from the Department of Anatomy of the Virginia Commonwealth University (Richmond, VA). P.B. is a recipient of the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

REFERENCES

1. Risau, W., Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int. Suppl.* **67,** S3–S6, 1998.
2. Thorin, E., and Shreeve S. M., Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol. Ther.* **78,** 155–166, 1998.
3. Aird, W. C., Jahroudi, N., Weiler-Guettler, H., Rayburn, H. B., and Rosenberg, R. D., Human von Willebrand factor gene sequences target expression to a subpopulation of endothelial cells in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92,** 4567–4571, 1995.
4. Aird, W. C., Edelberg, J. M., Weiler-Guettler, H., Simmons, W. W., Smith, T. W., and Rosenberg, R. D., Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J. Cell Biol.* **138,** 1117–1124, 1997.
5. Girard, J. P., Baekkevold, E. S., Yamanaka, T., Haraldsen, G., Brandtzaeg, P., and Amalric F., Heterogeneity of endothelial cells: The specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am. J. Pathol.* **155,** 2043–2055, 1999.
6. Risau, W., Esser, S., and Engelhardt, B., Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. *Pathol. Biol.* **46,** 171–175, 1998.
7. Sasaki, K., Pabst, R., and Rothkotter, H. J., Development of the high endothelial venule in rat lymph node autografts. *Anat. Rec.* **238,** 473–479, 1994.
8. Kraal, G., Schornagel, K., Savelkoul, H., and Maruyama, T., Activation of high endothelial venules in peripheral lymph nodes. The involvement of interferon-gamma. *Int. Immunol.* **6,** 1195–1201, 1994.
9. Chin, Y. H., Ye, M. W., Cai, J. P., and Xu, X. M., Differential regulation of tissue-specific lymph node high endothelial venule cell adhesion molecules by tumour necrosis factor and transforming growth factor-beta 1. *Immunology* **87,** 559–565, 1996.
10. Tangemann, K., Gunn, M. D., Giblin, P., and Rosen, S. D., A high endothelial cell-derived chemokine induces rapid, efficient, and subset-selective arrest of rolling T lymphocytes on a reconstituted endothelial substrate. *J. Immunol.* **161,** 6330–6337, 1998.
11. Garlanda, C., and Dejana, E., Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17,** 1193–1202, 1997.
12. Brouland, J. P., Gilbert, M. A., Bonneau, M., Pignaud, G., Bal Dit Solier, C., and Drouet, L., Macro and microheterogeneity in normal endothelial cells: Differential composition of luminal glycocalyx and functional implications. *Endothelium* **6,** 251–262, 1999.
13. Düllman, J., Feldhaus, S., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., and Schumacher, U., A new lectin visualises the stroma architecture of white pulp and the sinuses of red pulp. *J. Histochem. Cytochem* **48,** 923–931, 2000.
14. Ruoslahti, E., and Rajotte, D., An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. *Annu. Rev. Immunol.* **18,** 813–827, 2000.
15. von Andrian, U. H., and M'Rini, C., In situ analysis of lymphocyte migration to lymph nodes. *Cell Adhes. Commun.* **6,** 85–96, 1998.
16. Baggiolini, M., Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392,** 565–568, 1998.
17. Tang, M. L., Steeber, D. A., Zhang, X. Q., and Tedder, T. F., Intrinsic differences in L-selectin expression levels affect T and B lymphocyte subset-specific recirculation pathways. *J. Immunol.* **160,** 5113–5121, 1998.
18. Etzioni, A., Doerschuk, C. M., and Harlan, J. M., Of man and mouse: Leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood* **94,** 3281–3288, 1999.
19. Holder, J. E., Kimpton, W. G., Washington, E. A., and Cahill, R. N., L-selectin expression on thymic emigrants defines two distinct tissue-migration pathways. *Immunology* **98,** 422–426, 1999.
20. Schmidt, E. E., MacDonald, I. C., and Groom, A. C., Comparative aspects of splenic microcirculatory pathways in mammals: The region bordering the white pulp. *Scanning Microsc.* **7,** 613–628, 1993.
21. Kraal, G., Schornagel, K., Streeter, P. R., Holzmann, B., and Butcher, E. C., Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen. *Am. J. Pathol.* **147,** 763–771, 1995.
22. Mebius, R. E., Schadee-Eestermans, I. L., and Weissman, I. L., MAdCAM-1 dependent colonization of developing lymph nodes involves a unique subset of CD4+CD3− hematolymphoid cells. *Cell Adhes. Commun.* **6,** 97–103, 1998.

dc_1678_19

23. Mebius, R. E., van Tuijl, S., Weissman, I. L., and Randall, T. D., Transfer of primitive stem/progenitor bone marrow cells from LT alpha−/− donors to wild-type hosts: Implications for the generation of architectural events in lymphoid B cell domains. *J. Immunol.* **161,** 3836–3843, 1998.
24. Nitschke, L., Floyd, H., Ferguson, D. J., and Crocker, P. R., Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells. *J. Exp. Med.* **189,** 1513–1519, 1999.
25. Gunn, M. D., Ngo, V. N., Ansel, K. M., Ekland, E. H., Cyster, J. G., and Williams, L. T., A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* **391,** 799–803, 1998.
26. Cyster, J. G., Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* **286,** 2098–2102, 1999.
27. Lepault, F., Gagnerault, M. C., Faveeuw, C., and Boitard, C., Recirculation, phenotype and functions of lymphocytes in mice treated with monoclonal antibody MEL-14. *Eur. J. Immunol.* **24,** 3106–3112, 1994.
28. Bradley, L. M., Watson, S. R., and Swain, S. L., Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *J. Exp. Med.* **180,** 2401–2406, 1994.
29. Arbones, M. L., Ord, D. C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D. J., and Tedder, T. F., Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* **1,** 247–260, 1994.
30. Bradley, L. M., Malo, M. E., Fong, S., Tonkonogy, S. L., and Watson, S. R., Blockade of both L-selectin and alpha4 integrins abrogates naive CD4 cell trafficking and responses in gut-associated lymphoid organs. *Int. Immunol.* **10,** 961–968, 1998.
31. Crowley, M. T., Reilly, C. R., and Lo, D., Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen. *J. Immunol.* **163,** 4894–4900, 1999.
32. Borrello, M. A., and Phipps, R. P., Differential Thy-1 expression by splenic fibroblasts defines functionally distinct subsets. *Cell. Immunol.* **173,** 198–206, 1996.
33. Garcia De Vinuesa, C., Gulbranson-Judge, A., Khan, M., O'Leary, P., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G. G., Owen, M. J., and MacLennan, I. C., Dendritic cells associated with plasmablast survival. *Eur. J. Immunol.* **29,** 3712–3721, 1999.
34. van Rooijen, N., Kors, N., and Kraal, G., Macrophage subset repopulation in the spleen: differential kinetics after liposome-mediated elimination. *J. Leukocyte Biol.* **45,** 97–104, 1989.
35. Arber, D. A., Strickler, J. G., Chen, Y. Y., and Weiss, L. M., Splenic vascular tumors: A histologic, immunophenotypic, and virologic study. *Am. J. Surg. Pathol.* **21,** 827–835, 1997.
36. Kohler, G., and Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256,** 495–497, 1975.
37. Balázs, M., Grama, L., and Balogh, P., Detection of phenotypic heterogeneity within the murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies IBL-7/1 and IBL-7/22. *Hybridoma* **18,** 177–182, 1999.
38. Balázs, M., Horváth, G., and Balogh, P., Simple determination of donor/host origin and donor leukocyte subsets in rat-mouse chimeras. *J. Immunol. Methods* **218,** 117–121, 1998.
39. Mason, D. W., Penhale, W. J., and Sedgwick, J. D., Preparation of lymphocyte subpopulations. *In* "Lymphocytes: A Practical Approach" (G. G. B Klaus, Ed.), p. 35, IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, 1987.
40. Goerdt, S., Walsh, L. J., Murphy, G. F., and Pober, J. S., Identification of a novel high molecular weight protein preferentially expressed by sinusoidal endothelial cells in normal human tissues. *J. Cell Biol.* **113,** 1425–1437, 1991.
41. Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A., and Greaves, M. F., Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* **75,** 2417–2426, 1990.
42. Lin, G., Finger, E., and Gutierrez-Ramos, J. C., Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur. J. Immunol.* **25,** 1508–1516, 1995.
43. Kudo, E., Hirose, T,. Sano, T., and Hizawa, K., Epitopic heterogeneity of the CD36 antigen expressed by normal and neoplastic endothelial cells. An immunohistochemical study with a novel monoclonal antibody 8C9. *Acta Pathol. Jpn.* **42,** 807–817, 1992.
44. Cheng, J., Baumhueter, S., Cacalano, G., Carver-Moore, K., Thibodeaux, H., Thomas, R., Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Hague, N., Moore, M., and Lasky, L. A., Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34 *Blood* **87,** 479–490, 1996.
45. Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C., and Keller, G., A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* **125,** 725–732, 1998.
46. Eichmann, A., Corbel, C., Nataf, V., Vaigot, P., Breant, C., and Le Douarin, N. M., Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94,** 5141–5146, 1997.
47. Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A., and Rafii, S., Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* **95,** 952–958, 2000.
48. Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L. R., Moore, M. A., Storb, R. F., and Hammond, W. P., Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* **92,** 362–367, 1998.
49. Nakayama, N., Fang, I., and Elliott, G., Natural killer and B-lymphoid potential in CD34+ cells derived from embryonic stem cells differentiated in the presence of vascular endothelial growth factor. *Blood* **91,** 2283–2295, 1998.
50. Matloubian, M., David, A., Engel, S., Ryan, J. E., and Cyster, J. G., A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nature Immunol.* **1,** 298–304, 2000.
51. Koike, R., Watanabe, T., Satoh, H., Hee, C. S., Kitada, K., Kuramoto, T., Serikawa, T., Miyawaki, S., and Miyasaka, M., Analysis of expression of lymphocyte homing-related adhesion molecules in ALY mice deficient in lymph nodes and Peyer's patches. *Cell Immunol.* **180,** 62–69, 1997.
52. Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C., and Carsetti, R. J., B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* **190,** 75–89, 1999.
53. Vecchi, A., Garlanda, C., Lampugnani, M. G., Resnati, M., Matteucci, C., Stoppacciaro, A., Schnurch, H., Risau, W., Ruco, L., Mantovani, A., and Dejana, E., Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur. J. Cell Biol.* **63,** 247–254, 1994.
54. Takahashi, K., Kozono, Y., Waldschmidt, T. J., Berthiaume, D., Quigg, R. J., Baron, A., and Holers, V. M., Mouse complement receptors type 1 (CR1;CD35) and type 2 (CR2;CD21): Expres-

dc_1678_19

sion on normal B cell subpopulations and decreased levels during the development of autoimmunity in MRL/lpr mice. *J. Immunol.* **159,** 1557–1569, 1997.

55. Bishop, G. A., Ramirez, L. M., and Waldschmidt, T. J., Differential responses to Ig and class II-mediated signals in splenic B cell subsets from normal and autoimmune mice. *Int. Immunol.* **6,** 1049–1059, 1994.
56. Oliver, A. M., Martin, F., Gartland, G. L., Carter, R. H., and Kearney, J. F., Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur. J. Immunol.* **27,** 2366–2374, 1997.
57. Kraal, G., and Janse, M., Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. *Immunology* **58,** 665–669, 1986.
58. Dijkstra, C. D., Van Vliet, E., Dopp, E. A., van der Lelij, A. A., and Kraal, G., Marginal zone macrophages identified by a monoclonal antibody: Characterization of immuno- and enzyme-histochemical properties and functional capacities. *Immunology* **55,** 23–30, 1985.
59. Crowley, M. T., Reilly, C. R., and Lo, D., Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen. *J. Immunol.* **163,** 4894–4900, 1999.

dc_1678_19

International Reviews of Immunology, Early Online:1–14, 2015
Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN: 0883-0185 print / 1563-5244 online
DOI: 10.3109/08830185.2015.1059427

informa
healthcare

REVIEW

Divergence of Vascular Specification in Visceral Lymphoid Organs—Genetic Determinants and Differentiation Checkpoints

Zoltán Kellermayer,[1,2] Haruko Hayasaka,[3] Béla Kajtár,[4] Diána Simon,[1] Eloy F. Robles,[5] Jose A. Martinez-Climent,[5] and Péter Balogh[1,2]

[1]Department of Immunology and Biotechnology; [2]Lymphoid Organogenesis Research Group Szentágothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary; [3]Laboratory of Immunoregulation, Osaka University Graduate School of Medicine, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan; [4]Department of Pathology, University of Pécs, Pécs, Hungary; [5]Centro de Investigación Médica Aplicada of the University of Navarra, Pamplona, Spain

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

Summary

Despite their functional similarities, peripheral lymphoid tissues are remarkably different according to their developmental properties and structural characteristics, including their specified vasculature. Access of leukocytes to these organs critically depends on their interactions with the local endothelium, where endothelial cells are patterned to display a restricted set of adhesion molecules and other regulatory compounds necessary for extravasation. Recent advances in high throughput analyses of highly purified endothelial subsets in various lymphoid tissues as well as the expansion of various transgenic animal models have shed new light on the transcriptional complexities of lymphoid tissue vascular endothelium. This review is aimed at providing a comprehensive analysis linking the functional competence of spleen and intestinal lymphoid tissues with the developmental programming and functional divergence of their vascular specification, with particular emphasis on the transcriptional control of endothelial cells exerted by Nkx2.3 homeodomain transcription factor.

Keywords Endothelium, Nkx2.3, patterning, Peyer patches, spleen

GENERAL INTRODUCTION—IMPACT OF VASCULAR DEVELOPMENT IN LYMPHOID TISSUE CONNECTIONS

Although disseminated throughout the organism, the peripheral lymphoid organs of the immune system in both rodents and humans form a highly integrated and efficient system for eliminating pathogens. With the exception of spleen, the earliest secondary lymphoid organ already present in cartilaginous fishes, the typical mammalian lymphoid organs such as lymph nodes and mucosal lymphoid tissues, form extensive networks. This segregation poses a considerable challenge for synchronized

Accepted 24 May 2015.
Address correspondence to Dr. Péter Balogh, Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7624 Pécs, Hungary. E-mail: balogh.peter@pte.hu

RIGHTSLINK

dc_1678_19

functionality, as leukocytes commuting between these locations require selective signals for dispersion to lymphoid tissues formed mostly at predetermined locations.

The connections between distant organs and, within tissues, between various compartments, respectively, are established via at least three different tubing systems. For all lymphoid tissues, the bulk of leukocytes arrive via the blood circulation, which also provides nutrients and oxygen. Peripheral lymph nodes draining skin and lymph nodes draining mucosal (particularly intestinal) body parts allow the entry of dendritic cells via afferent lymphatic capillaries. As integration sites for cellular contacts, the leukocytes enter the extravascular regions of lymphoid organs. Here, upon the effect of selective chemokine guidance the leukocytes are recruited to distinct tissue compartments, where the directionality is promoted by the existence of a fibroreticular tubing system. This avascular transport system (also termed conduit) [1] emanating from perivascular fibroblastic reticular cells serves as a delivery route for low molecular weight proteins (including homeostatic chemokines) and also allows for antigen sampling by dendritic cells [2]. Thus the selective colonization of peripheral lymphoid tissues by hematopoietic cells is critically dependent on the simultaneous specialization of its vascular elements, occurring during the prenatal period in both humans and rodents.

Importantly, the leukocyte distribution is manifested in an organ-dependent manner. As immediate partners for leukocyte recognition, the endothelial cells lining the specialized vascular beds within lymph nodes and Peyer patches participate in the early phase of leukocyte homing and extravasation. For achieving this capability in an organ-specific manner, the vascular endothelial cells within peripheral lymphoid organs are patterned along divergent specification routes, as evidenced by their distinct adhesion molecule profiles involved in homing. Interestingly, as transplantation studies using either stromal constituents or organ fragments from perinatal spleen or young adult mesenteric lymph nodes suggest, the organ-specific vasculature is preserved upon the regeneration of lymphoid tissues at ectopic locations, indicating a long-lasting commitment in endothelial specification [3, 4].

Although in recent years a significant progress has been made in investigating the transcriptional and functional characteristics of various stromal elements (recently reviewed in [5–7]), there is still only a marginal knowledge concerning the developmental aspects of endothelial heterogeneity and complexity of blood vasculature within the peripheral lymphoid organs during their formation. In that respect studying both the differential patterning of endothelial cells between lymphoid and non-lymphoid organs as well as amongst different peripheral lymphoid tissues may significantly broaden our understanding of the impact of nonhematopoietic elements on the functionality of peripheral lymphoid tissues. Moreover, as the formation of ectopic (tertiary) lymphoid tissues in chronic inflammations and organ-specific autoimmune diseases during the postnatal period is also coupled with the vessels' modulation towards lymphoid organ-like vasculature, deciphering the factors guiding the vascular specification and patterning within secondary lymphoid tissues can also expand the target spectrum for these pathological conditions.

Sequential Emergence of the Splenic Vasculature During Organogenesis

The first indication of spleen formation in embryos is a condensation of mesenchymal cells at the dorsal mesogastrium in the territory which also gives rise to some elements of the pancreas. The early specification of splenic mesoderm is evidenced through the production of several transcription factors, including Tlx1/Hox11, Bapx1/Nkx3.2, Wt1, Tcf21, Nkx2.5, Pbx1, and Sox11, establishing complex regulatory circuits with as yet incompletely charted hierarchic relationships [8]. Recent findings in fate-mapping studies indicate that in the mesenchymal commitment towards splenic fate the

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

co-expression of Nkx2.5/Islet1 transcription factors identifies a common stromal precursor population that may mature into various stromal cells, including perivascular (mural) pericytes and fibroblastic reticular cells (FRCs), marginal reticular cells (MRCs), and follicular dendritic cells (FDCs) [9]. Although the details of developmental or lineage relationship between these stromal constituents are not known yet, the perivascular cells (both within the spleen and other tissue locations) in adult mice are able to generate FDCs [10]. However, the splenic endothelial cells seem to evolve from other precursors [9], although their organization is also dependent on interactions involving the receptor for lymphotoxin alpha/lymphotoxin beta2 heterotrimer (LTβR) [11].

The emergence of committed splenic stromal anlage at around embryonic day 11–12 (11.5 dpc) is coupled with vasculogenesis. Shortly after the specification of spleen anlage at around 13.5 dpc, while the stomach is still firmly attached to the emerging spleen, mucosal addressin cell adhesion molecule (MAdCAM-1) is expressed by the endothelial cells of splenic vessels, albeit without any clear segregation of future red pulp and white pulp compartments. Within the spleen the MAdCAM-1-positive vessels are mainly comprised of a few larger vessels and several smaller caliber branches [12]. However, this MAdCAM-1 expression is not restricted to the spleen, as the lamina propria vessels within the adjacent stomach and in other organs are also lined by MAdCAM-1$^+$ endothelium. At the same period hematopoietic c-*kit*$^+$ cell accumulation and stroma-associated VCAM-1 expression are also present. Although the red pulp and white pulp vasculature are not specified at this stage yet, as the first indication of future vascular divergence the vessels identifiable with IBL-9/2 rat monoclonal antibody are present [13], and will subsequently form the major fraction of the venous segments in the red pulp (Figure 1).

The initial sign for subsequent lymphoid territory formation within the splenic anlage is characterized by the appearance of lymphoid tissue inducer (LTi) cells with CD4$^+$/CD3$^-$ phenotype around arterial segments that express VE-cadherin and lack MECA-32 marker at 14.5 dpc, followed by the ring-like clustering of LTi cells after 16.5 dpc. At this stage, the red pulp-restricted IBL-9/2$^+$ vessels are distributed unevenly, with some regions in the inner part of the spleen relatively devoid of these vessels, corresponding to the emerging white pulp, where the MAdCAM-1 expression is also appreciably less dense (Figure 1). Importantly, while LTβR engagement is necessary for the postnatal maturation and organization of white pulp, including the selective production of homeostatic chemokines CCL19/21 and CXCL13 by fibroblastic reticular cells (FRCs) and FDCs, respectively, the relative paucity of hematopoietic cells expressing LT$\alpha_1\beta_2$ suggests that the prenatal segregation of white pulp and red pulp vasculature is independent from LTβR activity [12]. On the other hand, the postnatal clustering of VEGF-R2-positive endothelial cells for the establishment of marginal zone with MAdCAM-1$^+$ rim requires LTβR [11]. In contrast, the absence of TNF does not result in any substantial deviation of splenic vasculature.

HEV Development as Part of Secondary Lymphoid Tissue Formation

In lymph nodes and Peyer patches (PP), high endothelial venules (HEVs) serve as sites for lymphocyte extravasation. In peripheral lymph nodes (pLNs) of adult mice HEVs express peripheral node addressin (PNAd) while the main addressin participating in mucosal homing is MAdCAM-1. These addressins are recognized by L-selectin and $\alpha_4\beta_7$ integrin, respectively, expressed by leukocytes. The differential expression pattern of specific chemokines further contributes to directing selective recruitment of lymphocyte subsets at various locations. CCL21 directs both T cells and B cells to pLNs and also to extrafollicular HEVs of PPs via CCR7 expressed on lymphocytes, while follicular HEVs in PPs display CXCL13 which binds CXCR5 on B cells [14–16].

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

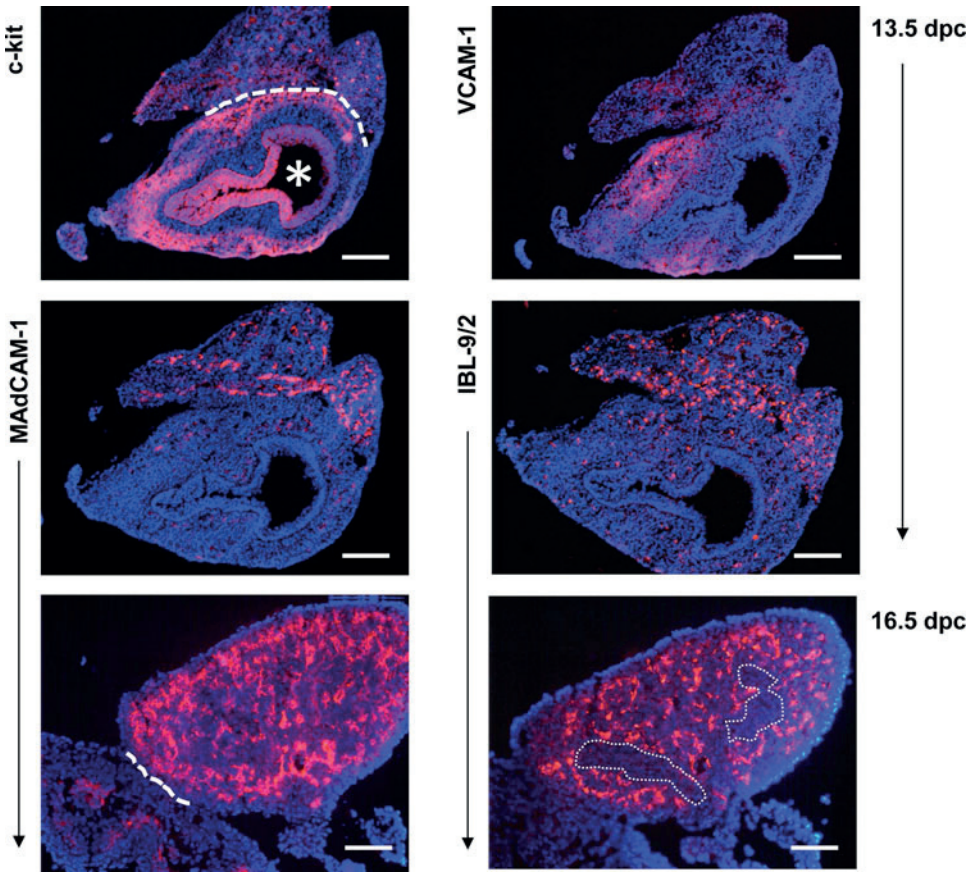


FIGURE 1. Prenatal patterning of splenic vasculature in mice. Embryonic day 13.5 (vaginal plug considered as 0.5 dpc; top and middle pairs) and 16.5 dpc spleens (bottom pair) were stained for various markers using red fluorescence as indicated, with DAPI nuclear counterstaining. Dashed lines in top left and bottom left insert indicate the approximate separation line between the stomach and spleen. The asterisk in the upper left image indicates the stomach lumen. The regions encircled by dotted line in the lower right image indicate the early segregation of red pulp containing extensive meshwork of IBL-9/2-positive vessels (Scale bars: 50 μm).

This is shown schematically in Figure 2. At birth, all lymph nodes and PPs HEVs express MAdCAM-1 [17]. Importantly, the endothelial expression of MAdCAM-1 is not restricted to the site of developing lymphoid tissues, but can be observed at other locations within the gut. In primordial lymphoid tissues the display of MAdCAM-1 enables the entry of $\alpha_4\beta_7^+$ lymphoid tissue inducer cells, needed for the formation of secondary lymphoid organs. In pLNs PNAd appears only during the first postnatal month as MAdCAM-1 is gradually downregulated, while MAdCAM-1 remains the main addressin in PPs. In mesenteric lymph nodes (mLN) both PNAd and MAdCAM-1 participate in the homing of lymphocytes. This divergent preservation of MAdCAM-1 compared to the acquisition of (in mLNs) or replacement (in pLNs) by PNAd suggests territory-dependent alternative endothelial patterning.

Initial events during PP and pLN formation have been extensively investigated [18], reviewed recently in [19]. In pLN development the lymphatic vessel formation appears to precede the emergence of nodal blood vasculature and is independent from the organogenesis of pLN [20]. The commitment along lymphatic endothelium requires the activity of transcription factor Prox-1 [21]. Under the influence of Prox-1, venous

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

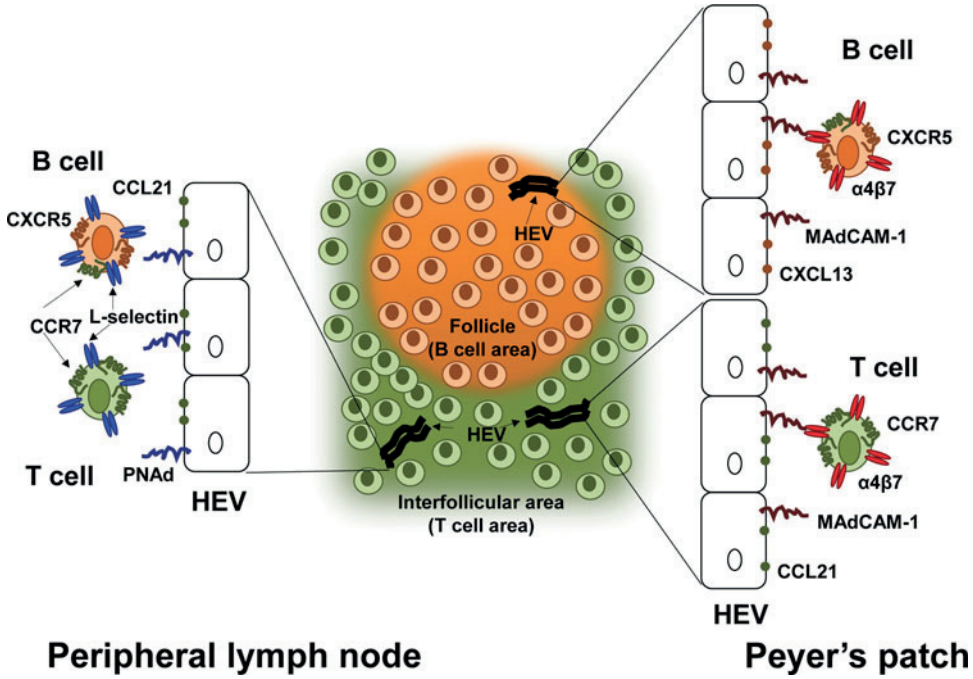


FIGURE 2. Adhesion molecules and homeostatic chemokines and receptors involved in the differential homing of lymphocytes to peripheral lymph node (left) and Peyer's patches (right), in latter site with the subset-related differences of B-cell homing via follicular HEVs and T-cell homing via the T-zone HEVs.

endothelial cells gain lymphatic identity, leading to the subsequent appearance of a range of cell surface markers, including podoplanin and LYVE-1 [22]. Prox-1 together with FOXC2 through Connexin 37 (Cx37) may also affect the physical adaptation of collecting lymphatic vessels to fluid shear stress, including the formation of lymphatic valves close to bifurcation points. In that respect, an intriguing embryonic microheterogeneity of lymphatic endothelial cells (LECs) has been observed, with regard to the expression of VEGF-R2, VEGF-R3, and neurolipin-2 between sprouting capillaries and valve-forming segments [23], reflecting their different patterning. In addition, more recently platelets as potential partners of LECs in developing lymphatic vessels have also been identified, where lymphatic endothelium-associated podoplanin initiates a signaling event mediated by platelet-associated C-type lectin–like receptor 2 (CLEC2) through tyrosine kinase Syk to promote the separation of blood vasculature and lymphatics between the subclavian vein and the thoracic duct [24]. The formation of functional HEVs takes place sometime during these events, and together with the appearance of adhesion molecules it leads to the recruitment of mature lymphocytes to the LNs around postnatal day 2 [25] and to the PPs around 18.5 dpc [26]. MAdCAM-1 first appears in the gut at 9.5 dpc, before PP anlage formation, and is expressed by venous endothelial cells in the intestine. In PPs, MAdCAM-1 is initially expressed in a homogenous manner at 16.5 dpc. By 17.5 dpc this is a net-like pattern and is finally restricted to HEVs by the second day after birth (2 dpp) while expression surrounding the PP disappears. MAdCAM-1^+ HEVs associate to follicles and surround them by 2 dpp. This patterning of MAdCAM-1^+ HEVs is consistent with the positioning of B cells within PPs as B cells appear around 18.5 dpc and are first distributed evenly, while compartmentalization of B cells into developing follicular structures happens around 1-2 dpp. However, it seems that early compartmentalization and development

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

of MAdCAM-1$^+$ HEVs is independent of mature lymphocytes as a similar staining pattern of MAdCAM-1 was observed in SCID mice in the absence of mature T and B cells.

Once formed, HEVs require constant signaling to maintain their cuboid architecture, as isolated high endothelial cells (HECs) rapidly dedifferentiate under *in vitro* conditions [27]. Ligation of afferent lymphatics led to the reversible flattening of HEVs, together with the loss of luminal PNAd expression after 1 week, indicating the importance of lymph-borne factors in HEV maintenance [28].

Programming the Addressin Profile of HEVs

Earlier observations using suppression subtractive hybridization in human tonsillar HEV endothelial cells enriched by MECA-79 monoclonal antibody mediated selection have revealed preferential HEV-associated expression of several mRNA through cDNA analysis, including hevin (a secreted protein mediating endothelial adhesion), thrombospondin-1 (influencing angiogenesis and endothelial adhesion) and DARC (Duffy antigen receptor for chemokines), a promiscuous chemokine receptor [29]. Distinct HEV precursor cells have not been identified yet, although recently performed cDNA microarray studies from newborn and adult mLN HECs reveal that newborn mLN HECs express various genes associated with angiogenesis, supporting the idea that mature and functional HEVs develop postnatally from immature endothelial cells [30]. Exploiting improved approaches for cell subset isolation by cell sorting and high throughput sequencing, including various stromal cells and endothelial subsets (http://www.immgen.org), detailed transcriptome analyses from adult mice revealed regional differences in the RNA expression profile of HECs and also compared these tissues to capillary cells (CAPs) [31]. In contrast with HECs, CAPs rather possessed an antiadhesive gene profile and expressed higher levels of genes involved in angiogenesis. Intriguingly CAPs showed tissue-specific transcriptional pattern as Nkx2.3, a transcription factor regulating MAdCAM-1 expression (see below) was present in PP CAPs as well as PP HECs. As expected, RNA expression of MAdCAM-1 was higher in PP HECs compared to pLN while the genes coding the modifying enzymes important in creating the PNAd epitope were preferentially expressed in pLNs. In general, the results represented a higher steady-state inflammatory status of PP HEVs. Interestingly, the gene ST6Gal I, a sialyltransferase that creates an epitope recognized by CD22 expressed on B cells, was expressed selectively in PP HECs. Short-term homing experiments revealed the unique role of CD22 in B cell recruitment to PPs as impaired cell homing was observed in both the transfer of CD22$^{-/-}$ B cells to wild type recipients and wild type B cells to St6gal1$^{-/-}$ recipients. [31]. It remains to be determined whether the endothelial ligand recognition by CD22, an inhibitory receptor influencing BcR-mediated signals, alters the signaling threshold and functionality (stimulation or tolerization) of the gut-homing B cells [32].

Although the exact molecular and cellular requirements for HEV development are not known yet, it has been demonstrated that activation of the LTβR plays a major role in the development of a wide spectrum of peripheral lymphoid organs, including the HEV phenotype in pLNs. In IKKα^{AA} mice that lack inducible kinase activity and thus have a defective alternative NF-κB pathway, hypocellular LNs and decreased expression of HEV-specific genes (including Glycam1, GlcNAc6ST2, CCL21, CCL19, CXCL13) were observed [33]. Browning *et al.* demonstrated the LTβR-dependency of HEV formation with the administration of the LTβR-Ig fusion protein decoy receptor that interferes with LTβR activation. This treatment (but not the interference with TNFR activation) caused various defects in HEV morphology and cell homing to pLNs. Immunohistological stainings showed the absence of both PNAd and MAdCAM-1 (in mLNs), and also the reduction in mRNA levels of MAdCAM-1 and PNAd-associated core proteins and modifying enzymes [34]. It was later elegantly shown by Onder *et al.*

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

TABLE 1. HEV phenotype in various transgenic mice.

Genotype	HEV phenotype	Reference
RIP LT$\alpha\beta$	MAdCAM-1^{++} luminal PNAd^{++} HEC-6ST^{+}	[39]
RIP LTα	MAdCAM-1^{+} abluminal PNAd^{+} HEC-6ST^{-}	[36, 37, 39–41]
RIP LTα/LT$\beta^{-/-}$	MAdCAM-1^{+} PNAd^{-}	[40]
RIP LTα/RAG-1$^{-/-}$	MAdCAM-1^{+} PNAd^{-}	[37]
RIP LTα/TNFRI$^{-/-}$	MAdCAM-1^{-} PNAd^{-}	[40]
LT$\beta^{-/-}$	abluminal PNAd^{+} HEC-6ST^{-}	[39]
HEC-6ST$^{-/-}$	abluminal PNAd^{+}	[67]

Overexpression or absence of various LT ligands as indicated lead to several phenotypic changes in HEV profile.

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

with an endothelial specific LTβR ablation that the endothelial expression of LTβR is required for the development and function of HEVs. However, this paper focused only on pLNs and did not examine PPs [35].

Less is known about how HEVs are programmed to display a different set of addressins molecules in different SLOs. In the late 1990s and early 2000s, extensive research was performed to investigate the development of ectopic tertiary lymphoid organs in chronic inflammatory conditions, which are usually accompanied with the simultaneous development of HEVs. Together, these data highlighted the importance of the various lymphotoxin ligands in determining the addressin expression pattern of HEVs. Using mouse models where the different LT ligands were overexpressed behind the rat insulin promoter (RIP), it was possible to determine how the various LT forms direct HEV addressin expression. These results indicated that LTα, most probably in the form of LTα_3, is important in the upregulation of MAdCAM-1 expression on HEVs, and exerts its effect via TNF receptor I (TNFRI). Meanwhile, the PNAd epitope did not appear or was present only abluminally in the absence of LTβ, which forms a heterotrimer with LTα (LT$\alpha_1\beta_2$) and acts by binding to the LTβ receptor (LTβR) [36–41]. These observations are summarized in Table 1.

In vitro studies also revealed similar mechanisms. TNF, LPS, and IL-1 all induced MAdCAM-1 expression *in vitro* in bEnd.3 murine endothelial cell line [42], and this was shown to be mediated via NF-κB signaling pathway [43]. Recombinant murine LTα_3 induced MAdCAM-1, but not PNAd, expression in the same bEnd.3 cell line. This increase was larger than that seen after treatment with human LTα_3 or murine TNF [44].

These results still do not tell us what leads to MAdCAM-1 expression in mucosal lymphoid tissues and why PNAd is observed in pLNs. A plausible scenario is the higher occurrence of LTα_3 in PPs compared to LT$\alpha_1\beta_2$ with a reversed ratio in pLNs, while in mLNs a mixture of LT ligands would lead to presence of both addressins [39]. An important question is the source of the variable types of LT signals that activate the various receptors. Selective depletion of CD11c^{+} DCs led to hypocellular peripheral and mesenteric lymph nodes, while HEV phenotype reverted from the "mature" PNAd^{+}MAdCAM-1^{-} phenotype to an "immature," neonatal PNAd^{-}MAdCAM-1^{+} phenotype. The role of DCs in HEV maintenance was found to be mediated by LTα

Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

and β expressed on the CD11c$^+$ DCs. However, DC-derived LT signals seemed not to be important in maintaining PP HEV phenotype [45]. A potential non-T non-B cell type to provide LT signals for HEVs in the intestine may be RORγt$^+$ innate lymphoid cells, which have been recently reported to express LT [46].

However, the remarkable plasticity of HEVs should be noted. It has been reported that upon immunization with oxazolone, the "mature" PNAd$^+$ MAdCAM-1$^-$ HEV phenotype in pLNs is reverted to an "immature" PNAd$^-$ MAdCAM-1$^+$ phenotype, which is then subsequently reversed in a B-cell-dependent manner requiring LTβR-mediated signaling [47]. This suggests that the phenotype of adult HEV, at least in pLNs, is a dynamic structure and can be modified upon various environmental triggers. Importantly, the lack of embryonic expression of MAdCAM-1 does not seem to affect the establishment of postnatal PNAd-mediated homing in pLNs [48]. Also, an important transcriptional regulator, Nkx2.3 homeodomain-containing transcription factor has recently emerged as an important determinant for balancing the display of PNAd or MAdCAM-1 in HEV cells, where at least some events may be due to its role in transactivating MAdCAM-1 [49, 50].

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

Nkx2.3-Dependent and -Independent Vascular Development in the Visceral Lymphoid Organs

As discussed earlier, the formation of spleen anlage critically depends on the intricate hierarchy of transcription factors, including several members of the Nkx homeodomain-containing transcription factor family. In addition to those (Nkx3.2 and Nkx2.5) whose absence leads to asplenia, Nkx2.3 has a compartment-specific influence on the structural organization of spleen. Initial observations in two independent mouse mutants lacking Nkx2.3 revealed a severe atrophy of red pulp and the absence of MAdCAM-1 positive marginal sinus and adjacent MZ macrophages [49, 50]. In addition, the Peyer patches in adult Nkx2.3-deficient mice also lacked MAdCAM-1. Our subsequent analyses addressing the vascular organization of spleen established the near-complete lack of IBL-9/2$^+$ red pulp vasculature [51]. Furthermore, we also found that Nkx2.3-deficient neonates express endothelial MAdCAM-1, and its gradual disappearance during the postnatal period is accompanied with the parallel upregulation of PNAd containing the sulfoepitope reactive with MECA-79 mAb and major core protein GlyCAM-1, ultimately leading to the emergence of peripheral lymph node-like vasculature. This altered splenic patterning includes the appearance of PNAd-positive HEVs and presumably abortive lymphatic vessels, manifesting as LYVE-1-positive sacs. Similarly to HEV development in lymph nodes, these splenic ectopic HEVs require perinatal LTβR activity for development [52, 53].

Beyond these phenotypic changes, the deviation of vascular patterning is also reflected in the accompanying alterations in transcriptional regulation pointing towards the acquisition of peripheral lymph node-like HEV fate. Recently, we have found that *Dach1,* a chromatin-associated DNA binding protein, is expressed in MAdCAM-1 positive immature endothelial cells in the pLNs. Dach1 (Dachshund) is a DNA-binding nuclear protein influencing the development of eye (retina) and several epithelial tissues as well as the propagation of tumors, particularly breast, lung, and prostate [54, 55], with potential involvement of p53 binding and interference with Wnt signaling targets, such as c-myc and Cyclin D [56–58]. In Nkx2.3-deficient, but not wild-type spleen, Dach1 is also expressed in a significant proportion of HEV-like as well as the surrounding blood vessels. Notably, the expression pattern of Dach1 correlates temporally with the development of HEV-like blood vessels (Figure 3), supporting the idea that the ectopic HEV-like blood vessels in Nkx2.3-deficient spleen are generated in a fashion similar to the development of HEVs in lymph nodes.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

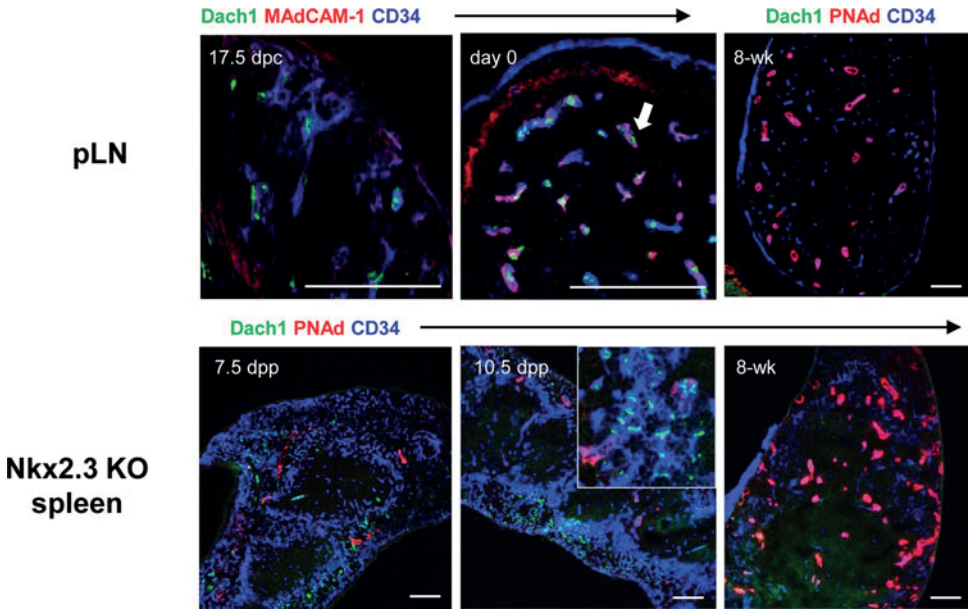


FIGURE 3. The expression patterns of Dach1 (green), PNAd or MAdCAM-1 (red), and CD34 (blue) protein in wild-type pLN and Nkx2.3 KO spleen. Dach1 is preferentially expressed in developing HEV endothelial cells in pLN of late-stage embryos and newborns. In the Nkx2.3 KO spleen, Dach1 expression is prominently detected in developing HEV-like and the surrounding blood vessels at early stages (7.5 and 10.5 dpp), whereas hardly observed in mature HEV-like blood vessels (8-wk). Scale bars: 50 μm.

Our subsequent work in Nkx2.3 mutant Peyer patches has also revealed that, similarly to the spleen, in the absence of Nkx2.3 HEV addressin profile is also altered during the postnatal period, resulting in the gradual shift to PNAd in a process requiring LTβR activity. This appearance of PNAd resembles the postnatal switch in the addressin profile observed in pLN HEVs [17] as the absence of Nkx2.3 does not prevent the neonatal endothelial expression of MAdCAM-1. The altered addressin profile in adult Nkx2.3$^{-/-}$ affects the lymphocyte composition of PPs with an increased ratio of CD3^{+} T cells and also leads to changes in the homing pattern as significantly less B cells homed to PPs compared to wild type. Interestingly, FDC-associated MAdCAM-1 expression is preserved throughout adulthood in mice, indicating divergent regulation for the constitutive (HEV endothelial) and inducible (FDC-associated) expression of MAdCAM-1 [59].

These findings point to an intriguing onset of Nkx2.3-mediated transcriptional regulation of vascular patterning. It is important to note that while in spleens the absence of Nkx2.3 results in the appearance of a vascular entity (HEV) uncharacteristic of wild-type spleen, in PPs "only" the profile of the vascular structure already present in wild-type samples is altered. Although Nkx2.3 clearly has a role in defining the spleen-like and Peyer patches-type vasculature from the embryonic period, its absence manifests only postnatally. Furthermore, although Nkx2 family members have a shared nucleotide recognition sequence, the absence of Nkx2.3 is not compensated by the residual activity of Nkx2.5, also expressed by embryonic spleen. Further Chip analyses are necessary to define the differences between the exact target specificities of Nkx2.5 and Nkx2.3 transcription factors, whereas the origin and cellular lineage relationship associated with Nkx2.3 expression may be deciphered with cell fate mapping studies, once

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

suitable murine mutants (i.e., harboring Nkx2.3-promoter driven *Cre* recombinase) are available.

Identification of Putative Nkx2.3-Dependent Vascular Segments in Human Spleen

While the above findings in mice clearly indicate the tissue/compartment-specific effect of Nkx2.3 on the organization and patterning of vasculature in both spleen and Peyer patches, corresponding data on the involvement of Nkx2.3 in the formation of splenic vessels in humans are entirely absent. On one hand, the arrangement of main splenic compartments in human and rodents are similar; on the other hand, however, both in terms of tissue architecture and immunological phenotype of some vascular segments important differences have been noted, particularly within the marginal zone and red pulp most affected by the absence of Nkx2.3. Thus human spleen lacks marginal sinus, and similarly to the mouse spleen, the endothelia of various vascular beds within the red pulp are also rather heterogeneous, comprising capillaries lined with endothelia of $CD34^+/CD141^-$ phenotype, red pulp sinuses with $CD34^-/CD141^+$ phenotype, and arterioles, venules, larger arteries, and veins with $CD34^+/CD141^+$ phenotype, respectively [60]. This structural and phenotypic discrepancy raises the question whether human spleens contain vessels equivalent to those affected in mice lacking Nkx2.3, therefore the mouse model may offer a valid system for studying the impact of Nkx2.3 in human splenic vasculogenesis. To determine the tissue location of endothelia with putative Nkx2.3 dependence in human spleens and correlate these findings with the consequences in Nkx2.3 deficiency in mice, we investigated the presence and characteristics of splenic vessels producing Nkx2.3 protein, using the new rat monoclonal antibody 454C/H9 developed by Dr. Giovanna Roncador (Monoclonal Antibodies Core Unit, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO, Madrid, Spain). This mAb was raised against recombinant human Nkx2.3 protein, and was tested extensively to exclude cross-reactivity with other Nkx family members. We used this mAb in single or double labeling immunohistochemistry after antigen retrieval of formaldehyde-fixed paraffin-embedded sections from normal human spleens removed from abdominal traumatic patients for the immunohistochemical analysis of Nkx2.3, revealed by peroxidase-conjugated anti-rat IgG. In dual staining, we used mouse mAbs against CD31, CD34 and von Willebrand factor (vWF) as endothelial markers, CD68 red pulp macrophage marker and alpha smooth muscle actin (αSMA) produced by myofibroblasts and pericytes in conjunction with alkaline phosphatase-labeled anti-mouse IgG, respectively. We found a nuclear Nkx2.3 expression of lumen-lining cells restricted to the red pulp. These $Nkx2.3^+$ cells are arranged in chord-like pattern. In dual labeling, we found that the nuclear $Nkx2.3^+$ cells are surrounded by αSMA^+ pericytes, but the pericytes themselves consistently lack Nkx2.3 protein. $CD68^+$ splenic macrophages were also devoid of detectable Nkx2.3 labeling. On the other hand, we found that while the Nkx2.3 protein is clearly expressed by vWF^+ endothelial cells within the red pulp, only a small fraction of $CD34^+$ endothelial cells produce this transcription factor (Figure 4). Taken together with the above phenotypic grouping of distinct splenic vascular beds, we conclude that the $Nkx2.3^+/CD31^+/CD34^-/vWF^+$ red pulp sinus endothelium subset ensheathed by αSMA^+ pericytes may correspond to the human equivalent of the IBL-$9/2^+$ segment of red pulp vasculature in murine spleen absent in Nkx2.3-deficient mice, although human embryonic spleen samples will also need to be investigated for a more thorough understanding of the emergence of this vascular segment. Considering the potential role of disbalanced expression of Nkx2.3 in various forms of inflammatory bowel diseases [61–64] with also possible expression in nonstromal cells (e.g., B lymphocytes) [65, 66], further analyses on the intestinal tissue distribution and its eventual alteration in other pathological conditions (lymphoproliferative diseases or chronic

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

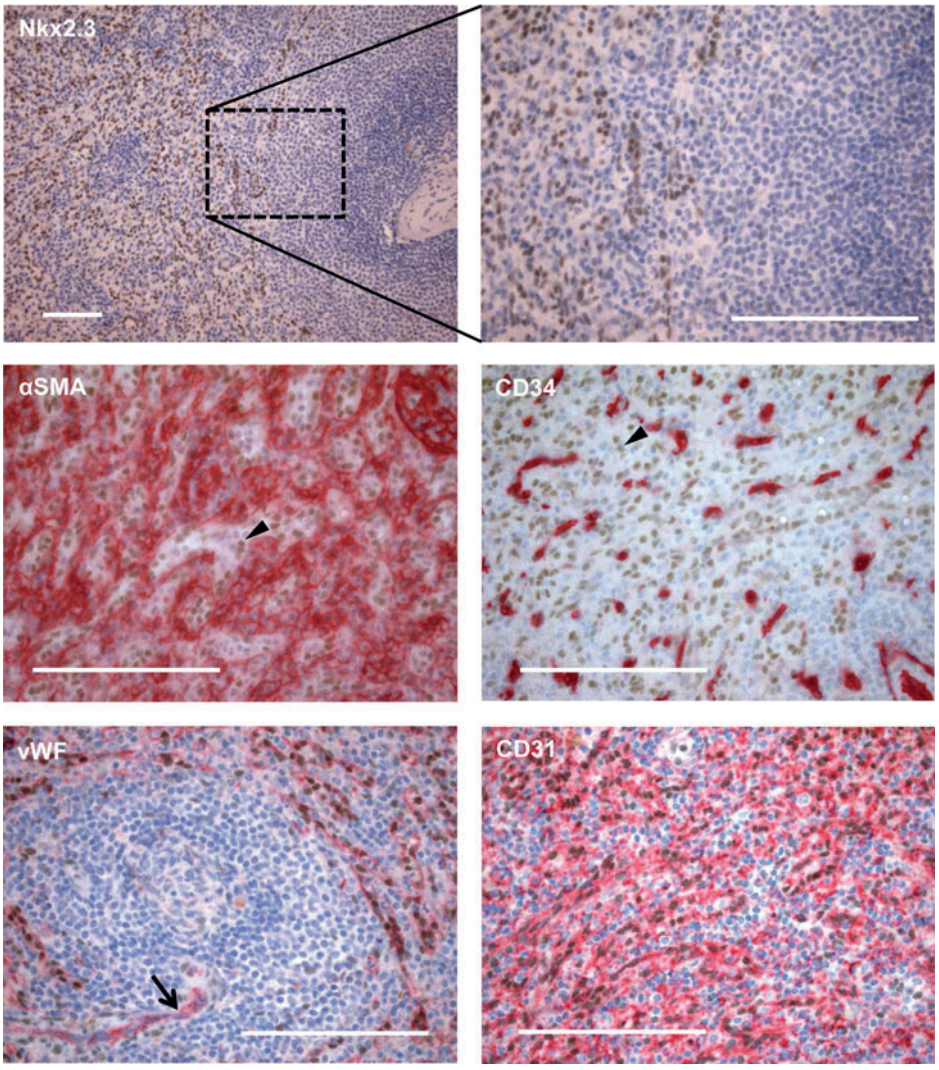


FIGURE 4. Immunohistochemical detection of Nkx2.3 protein in human spleen with 454C/H9 mAb. Brown nuclear reactivity is restricted to the red pulp (top left), in cells showing chorded arrangement (top right, with blue hematoxylin nuclear counterstain). These nuclear Nkx2.3-positive cells are surrounded with pericytes/reticular cells expressing αSMA (purple, arrowhead in middle/left), but are mostly negative for CD34 (purple, middle/right). vWF shows a strong co-localization with Nkx2.3 in the red pulp, while the white pulp arteriole displays only vWF (purple, arrow; bottom/left). In the red pulp sinuses an extensive co-localization can be observed between the expression of Nkx2.3 (brown) and CD31 (red, bottom/right; scale bars: 100 μm). The two-color immunohistochemical reactions were carried out using peroxidase-conjugated anti-rat IgG to reveal Nkx2.3, with the reference markers identified by AP-conjugated anti-mouse IgG.

inflammations) may also expand our understanding on how Nkx2.3 contributes to lymphoid organ development and immunological functionality in humans.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Giovanna Roncador (Monoclonal Antibodies Core Unit, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO, Madrid, Spain) for the production and

Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

generous supply of mAb against human NKX2-3 protein. This work was supported by SROP-4.2.2/B-10/1-2010-0029 and CABCOS II (HUHR/1001/2.1.3/0007) project grant at the University of Pécs. Z. K 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." P.B. is supported by the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K108429), and the research grant IBD-0341 from the Broad Medical Research Program of The Eli and Edythe Broad Foundation.

Declaration of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

REFERENCES

[1] Gretz JE, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S. Sophisticated strategies for information encounter in the lymph node: the reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic. J Immunol 1996;157(2):495–499.
[2] Sixt M, Kanazawa N, Selg M, et al. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. Immunity 2005;22(1):19–29.
[3] Ahrendt M, Hammerschmidt SI, Pabst O, et al. Stromal cells confer lymph node-specific properties by shaping a unique microenvironment influencing local immune responses. J Immunol 2008;181(3):1898–1907.
[4] Tan JK, Watanabe T. Murine spleen tissue regeneration from neonatal spleen capsule requires lymphotoxin priming of stromal cells. J Immunol 2014;193(3):1194–1203.
[5] Lu TT, Browning JL. Role of the lymphotoxin/LIGHT system in the development and maintenance of reticular networks and vasculature in lymphoid tissues. Front Immunol 2014;5:47.
[6] Malhotra D, Fletcher AL, Turley SJ. Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. Immunol Rev 2013;251(1):160–176.
[7] den Haan JM, Mebius RE, Kraal G. Stromal cells of the mouse spleen. Front Immunol 2012;3:201.
[8] Brendolan A, Ferretti E, Salsi V, et al. A Pbx1-dependent genetic and transcriptional network regulates spleen ontogeny. Development 2005;132(13):3113–3126.
[9] 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(4):782–791.
[10] Krautler NJ, Kana V, Kranich J, et al. Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. Cell 2012;150(1):194–206.
[11] Zindl CL, Kim TH, Zeng M, et al. The lymphotoxin LTalpha(1)beta(2) controls postnatal and adult spleen marginal sinus vascular structure and function. Immunity 2009;30(3):408–420.
[12] Vondenhoff MF, Desanti GE, Cupedo T, et al. Separation of splenic red and white pulp occurs before birth in a LTalphabeta-independent manner. J Leukoc Biol 2008;84(1):152–161.
[13] 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(2):126–137.
[14] Okada T, Ngo VN, Ekland EH, et al. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. J Exp Med 2002;196(1):65–75.
[15] Ebisuno Y, Tanaka T, Kanemitsu N, et al. Cutting edge: the B cell chemokine CXC chemokine ligand 13/B lymphocyte chemoattractant is expressed in the high endothelial venules of lymph nodes and Peyer's patches and affects B cell trafficking across high endothelial venules. J Immunol 2003;171(4):1642–1646.
[16] Warnock RA, Campbell JJ, Dorf ME, et al. The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. J Exp Med 2000;191(1):77–88.
[17] Mebius RE, Streeter PR, Michie S, et al. 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(20):11019–11024.
[18] Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. Nat Rev Immunol 2003;3(4):292–303.
[19] van de Pavert SA, Mebius RE. Development of secondary lymphoid organs in relation to lymphatic vasculature. Adv Anat Embryol Cell Biol 2014;214:81–91.
[20] Vondenhoff MF, van de Pavert SA, Dillard ME, et al. Lymph sacs are not required for the initiation of lymph node formation. Development 2009;136(1):29–34.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

[21] Wigle JT, Harvey N, Detmar M, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. EMBO J 2002;21(7):1505–1513.
[22] Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin OV, et al. Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. Genes Dev 2007;21(19):2422–2432.
[23] Sabine A, Agalarov Y, Maby-El Hajjami H, et al. Mechanotransduction, PROX1, and FOXC2 cooperate to control connexin37 and calcineurin during lymphatic-valve formation. Dev Cell 2012;22(2):430–445.
[24] Hess PR, Rawnsley DR, Jakus Z, et al. Platelets mediate lymphovenous hemostasis to maintain blood-lymphatic separation throughout life. J Clin Invest 2014;124(1):273–284.
[25] Cupedo T, Jansen W, Kraal G, Mebius RE. Induction of secondary and tertiary lymphoid structures in the skin. Immunity 2004;21(5):655–667.
[26] Hashi H, Yoshida H, Honda K, et al. Compartmentalization of Peyer's patch anlagen before lymphocyte entry. J Immunol 2001;166(6):3702–3709.
[27] Lacorre DA, Baekkevold ES, Garrido I, et al. Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. Blood 2004;103(11):4164–4172.
[28] Mebius RE, Streeter PR, Breve J, et al. The influence of afferent lymphatic vessel interruption on vascular addressin expression. J Cell Biol 1991;115(1):85–95.
[29] Girard JP, Baekkevold ES, Yamanaka T, et al. Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. Am J Pathol 1999;155(6):2043–2055.
[30] Hayasaka H, Taniguchi K, Fukai S, Miyasaka M. Neogenesis and development of the high endothelial venules that mediate lymphocyte trafficking. Cancer Sci 2010;101(11):2302–2308.
[31] Lee M, Kiefel H, LaJevic MD, et al. Transcriptional programs of lymphoid tissue capillary and high endothelium reveal control mechanisms for lymphocyte homing. Nat Immunol 2014;15(10):982–995.
[32] Nitschke L. CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions. Immunol Rev 2009;230(1):128–143.
[33] Drayton DL, Bonizzi G, Ying X, et al. I kappa B kinase complex alpha kinase activity controls chemokine and high endothelial venule gene expression in lymph nodes and nasal-associated lymphoid tissue. J Immunol 2004;173(10):6161–6168.
[34] Browning JL, Allaire N, Ngam-Ek A, et al. Lymphotoxin-beta receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. Immunity 2005;23(5):539–550.
[35] Onder L, Danuser R, Scandella E, et al. Endothelial cell-specific lymphotoxin-beta receptor signaling is critical for lymph node and high endothelial venule formation. J Exp Med 2013;210(3):465–473.
[36] Picarella DE, Kratz A, Li CB, et al. Insulitis in transgenic mice expressing tumor necrosis factor beta (lymphotoxin) in the pancreas. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89(21):10036–10040.
[37] Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. J Exp Med 1996;183(4):1461–1472.
[38] Drayton DL, Chan K, Lesslauer W, et al. Lymphocyte traffic in lymphoid organ neogenesis: differential roles of Ltalpha and LTalphabeta. Adv Exp Med Biol 2002;512:43–48.
[39] Drayton DL, Ying X, Lee J, et al. Ectopic LT alpha beta directs lymphoid organ neogenesis with concomitant expression of peripheral node addressin and a HEV-restricted sulfotransferase. J Exp Med 2003;197(9):1153–1163.
[40] Cuff CA, Sacca R, Ruddle NH. Differential induction of adhesion molecule and chemokine expression by LTalpha3 and LTalphabeta in inflammation elucidates potential mechanisms of mesenteric and peripheral lymph node development. J Immunol 1999;162(10):5965–5972.
[41] Sacca R, Cuff CA, Lesslauer W, Ruddle NH. Differential activities of secreted lymphotoxin-alpha3 and membrane lymphotoxin-alpha1beta2 in lymphotoxin-induced inflammation: critical role of TNF receptor 1 signaling. J Immunol 1998;160(1):485–491.
[42] Sikorski EE, Hallmann R, Berg EL, Butcher EC. The Peyer's patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin, is induced on a murine endothelial cell line by tumor necrosis factor-alpha and IL-1. J Immunol 1993;151(10):5239–5250.
[43] Takeuchi M, Baichwal VR. Induction of the gene encoding mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1 by tumor necrosis factor alpha is mediated by NF-kappa B proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92(8):3561–3565.
[44] Cuff CA, Schwartz J, Bergman CM, et al. Lymphotoxin alpha3 induces chemokines and adhesion molecules: insight into the role of LT alpha in inflammation and lymphoid organ development. J Immunol 1998;161(12):6853–6860.
[45] Moussion C, Girard JP. Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. Nature 2011;479(7374):542–546.
[46] Tumanov AV, Koroleva EP, Guo X, et al. Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge. Cell Host Microbe 2011;10(1):44–53.

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

[47] Liao S, Ruddle NH. Synchrony of high endothelial venules and lymphatic vessels revealed by immunization. J Immunol 2006;177(5):3369–3379.
[48] 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.
[49] Pabst O, Forster R, Lipp M, et al. NKX2.3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen and mucosa-associated lymphoid tissue. EMBO J 2000;19(9):2015–2023.
[50] 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;224(2):152–167.
[51] Balogh P, Balazs M, Czompoly T, et al. 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(3):473–486.
[52] Czompoly T, Labadi A, Kellermayer Z, et al. Transcription factor Nkx2–3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen. J Immunol 2011;186(12):6981–6989.
[53] Kellermayer Z, Labadi A, Czompoly T, et al. 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(7):690–700.
[54] Kurusu M, Nagao T, Walldorf U, et al. Genetic control of development of the mushroom bodies, the associative learning centers in the Drosophila brain, by the eyeless, twin of eyeless, and Dachshund genes. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(5):2140–2144.
[55] Pallafacchina G, Francois S, Regnault B, et al. An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. Stem Cell Res 2010;4(2):77–91.
[56] Wu K, Jiao X, Li Z, et al. Cell fate determination factor Dachshund reprograms breast cancer stem cell function. J Biol Chem 2011;286(3):2132–2142.
[57] Yan W, Wu K, Herman JG, et al. Epigenetic regulation of DACH1, a novel Wnt signaling component in colorectal cancer. Epigenetics 2013;8(12):1373–1383.
[58] Chen K, Wu K, Cai S, et al. Dachshund binds p53 to block the growth of lung adenocarcinoma cells. Cancer Res 2013;73(11):3262–3274.
[59] Kellermayer Z, Mihalj 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(10):5284–5293.
[60] Steiniger B, Stachniss V, Schwarzbach H, Barth PJ. Phenotypic differences between red pulp capillary and sinusoidal endothelia help localizing the open splenic circulation in humans. Histochem Cell Biol 2007;128(5):391–398.
[61] 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(2):83–91.
[62] Plevy S, Silverberg MS, Lockton S, et al. Combined serological, genetic, and inflammatory markers differentiate non-IBD, Crohn's disease, and ulcerative colitis patients. Inflamm Bowel Dis 2013;19(6):1139–1148.
[63] 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(6):710–712.
[64] Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. Nat Genet 2007;39(7):830–832.
[65] 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 Crohns Colitis 2009;3(3):189–195.
[66] 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. Mol Genet Metab 2010;100(1):88–95.
[67] Hemmerich S, Bistrup A, Singer MS, et al. Sulfation of L-selectin ligands by an HEV-restricted sulfotransferase regulates lymphocyte homing to lymph nodes. Immunity 2001;15(2):237–247.

Int Rev Immunol Downloaded from informahealthcare.com by Kinki University Igakubu Library on 07/23/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

dc_1678_19

Cellular Immunology **214,** 45–53 (2001)
doi:10.1006/cimm.2001.1874, available online at http://www.idealibrary.com on IDEAL®

Ontogeny of the Follicular Dendritic Cell Phenotype and Function in the Postnatal Murine Spleen

Péter Balogh,[1] Yüksel Aydar, John G. Tew,* and Andras K. Szakal

*Department of Anatomy and *Department of Microbiology and Immunology, Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia 23298*

Received September 21, 2001; accepted November 10, 2001

Follicular dendritic cells (FDCs) represent a unique cell population of antigen trapping cells restricted to follicles within the secondary lymphoid tissues. FDCs appear to be involved in the formation of primary follicles during the ontogeny of lymphoid tissue. We sought to determine the kinetics and tissue distribution of cells in the spleen of newborn mice expressing various differentiation antigens restricted to FDCs using immunohistochemistry with monoclonal antibodies (mAb) against FDCs and *in vivo* immune complex binding and retention. The earliest FDC-specific marker displayed was the antigenic determinant recognized by the FDC-M1 mAb, which was detectable by Day 3 prior to follicle formation on cells located around the peripheral part of the developing white pulp. The appearance of CD21/35 (complement receptor Type 2 and 1, CR1.2) was observed at the end of the first week, revealing a focal pattern in B-cell-rich areas. In addition, at that time there were some FDC-M1-positive cells in the nonfollicular part of the periarteriolar region. The administration of anti-horseradish peroxidase antibody followed by soluble antigen HRP into 7-day-old newborn mice resulted in the trapping and retention of immune complexes onto FDCs even in the absence of Fcγ receptors. The appearance of another FDC-specific marker, FDC-M2, was observed during the second week after birth and was restricted on the cells located in the same area as CR1.2 cells. The Fcγ receptor Type II appeared on FDCs after the second postnatal week. The above sequence of phenotypic maturation could also be observed in newborns after lethal irradiation at Day 3. This indicates that not only mature FDCs but also their precursors are highly radioresistant, and their phenotypic maturation follows a programmed path that requires only a small number of mature B cells. © 2001 Elsevier Science (USA)

[1] To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Department of Anatomy, MCV VCU, 1101 East Marshall Street, Richmond, VA 23298. Fax: (804) 828-9477. E-mail: pbalogh@hsc.vcu.edu.

Key Words: **mouse spleen; development; follicular dendritic cells; phenotype.**

INTRODUCTION

The follicular dendritic cells (FDCs) constitute a major part of the nonlymphoid compartment of follicles in peripheral lymphoid tissues (1). Their functions include the capture and long-term retention of antigens in immune complex form (2, 3). The capture itself is mediated by an array of cell surface receptors that include complement receptors and Type II Fcγ receptors (4). Once bound, these immune complexes are displayed on the surface of FDCs and are instrumental in promoting the clonal expansion and affinity maturation of germinal center B cells (5). To facilitate the appropriate interaction between centroblasts and displayed immune complexes, the FDCs also provide a set of costimulatory and chemotactic signals (6).

In addition to the receptors involved in the antigen/immune complex capture, murine FDCs have been identified with monoclonal antibodies against certain cell surface determinants specifically expressed by FDCs. The availability of these mAbs and the FDCs' potential for the long-term retention of immune complexes (which is a sine qua non for considering them as such) offers the possibility of correlating the appearance of FDCs during ontogeny with their phenotype and function. Studies aimed at investigating the development of FDCs have demonstrated that interactions between both the LTβR and TNF-R/p55 by their ligands of the expanding TNF/LT (lymphotoxin) receptor–ligand families are necessary for the differentiation of FDCs (7, 8).

The spleen as a major secondary lymphoid tissue has often been used as subject for analysis in determining the various roles of TNF/LT ligand–receptor interactions in the development of the germinal center. In these experiments, the recipients on whose spleens the consequences of such cell transfer were examined were usually young adult mice. It is important to define the

0008-8749/01 $35.00
© 2001 Elsevier Science (USA)
All rights reserved.

dc_1678_19

ontogenic and phenotypic differentiation of FDCs prior to their involvement in immune responses. Unfortunately, data on the phenotype of the murine-splenic FDC during their early postnatal development is scanty and do not address the putative FDC precursors' ability for immune complex retention *in vivo*. In this paper, we describe the location and phenotype of possible FDC precursors in the neonatal spleen in both normal and irradiated newborns and correlate these findings with their follicular location. Furthermore, we tested their ability to retain HRP–anti-HRP immune complexes. The results show that the expression of various FDC-associated markers follows a temporal and structural pattern, which is resistant to irradiation. The ability of FDC-M1-positive cells to trap immune complexes coincides with the appearance of CR1.2 receptor on the cells with a follicular location. These characteristics identify them as FDCs. Of the structures capable of capturing immune complexes, we found that the appearance of CR1.2 on cells with a follicular location may allow them to function as FDCs. The differential expression of FDC-M1 and FDC-M2 lineage-associated markers during this process may also indicate the sequential maturation of cells involved in the formation of FDC networks.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Young adult BALB/c mice were purchased from Harlan, Indianapolis, and maintained under SPF conditions. The newborn mice at various ages were decapitated, and their spleens removed for immunohistochemical and flow cytometric studies. For study of radiation effects, 3-day-old mice were γ-irradiated using a Cs^{137} source at a dose of 750 rad. The animals were fed rodent chow, given water *ad libitum*, and handled in accordance with the approved IACUC protocol.

Antibodies and Other Reagents

The rat monoclonal antibodies against CR1.2 (CD21/35, clone 7G8), CD16/32 (clone 2.4G2), CD43 (clone S7), and CD45R/B220 (clone RA3-6B2) and Ter-119 against the Ly-76 (erythroid lineage) antigen were obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA). The sheep anti-rat IgG FITC conjugate was purchased from Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). The normal rat serum, rabbit anti-HRP, and HRP enzyme were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The FDC-M1 and FDC-M2 hybridoma cell lines were generously provided by Dr. Marie Kosco-Vilbois (Serono, Switzerland), and their supernatant was used as the source of primary antibody. The binding of rat mAbs was detected by biotinylated mouse anti-rat κ chain mAb (MRK-1) from BD Pharmingen. The biotinylated antibodies were developed using streptavidin–HRP conjugate and a substrate solution of 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma-Aldrich) in a 0.1 M Na-acetate buffer containing 0.03% H_2O_2. For two-color immunofluorescence the FDC-M1 monoclonal antibody was purified by Protein G affinity chromatography and was conjugated with biotin-3-sulfo-*N*-hydroxysuccinimide ester. The binding of biotinylated antibody was detected with streptavidin-phycoerythrin (BD Pharmingen).

Passive Immunization

The antibody-dependent retention of antigen was induced by injecting 100 μl of rabbit anti-HRP serum intraperitoneally into newborn mice at day 3 or 7, respectively, followed by ip injection of 50 μl of HRP dissolved in PBS at 0.1 mg/ml. One week later the mice were anesthetized, perfused with heparinized PBS, followed by fixative containing 1% paraformaldehyde (Fisher) and 0.9% electron microscopy grade glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) in 0.1 M cacodylate buffer (9), and used for vibratome sectioning.

Immunohistochemistry and Enzyme Histochemistry

After removal, spleens were frozen in CryoForm embedding medium (IEC, Needham, MA); 10-μm-thick cryostat sections were cut on a Leitz cryostat. Following acetone fixation for 10 min the sections were allowed to dry and stored frozen at -70°C. The sections were rehydrated and the endogenous peroxidase activity was quenched with incubation in PBS containing 0.1% phenylhydrazine-HCl. After washing the sections were saturated with 10% BSA and then incubated with unlabeled rat mAbs. The bound antibodies were detected using biotinylated mouse anti-rat κ chain mAb followed by incubation with streptavidin–HRP conjugate. The reaction was visualized using 3-amino-9-ethylcarbazole in a 0.1 M Na-acetate buffer containing 0.03% H_2O_2 (10).

The antigen trapping by FDCs was tested on 50-μm-thick vibratome sections. Sections were cut from the spleens of passively HRP-immunized mice following intracardiac perfusion as previously described (9). Peroxidase activity was developed using 0.1% diaminodenzidine hydrochloride (DAB) as chromogen in a 50 mM Tris buffer (pH 6.8) in the presence of 0.03% H_2O_2 as substrate.

The depleting effect of irradiation was determined on specimens labeled with mAbs against B220, CR1.2, FDC-M1, and FDC-M2 using BioQuant Nova software (BIOQUANT-R&M Biometrics, Inc., Nashville, TN).

The two-color immunofluorescent labeling was performed using anti-CR1.2 mAb, followed by incubation with FITC-conjugated sheep anti-rat IgG. The remaining binding sites were saturated with normal rat serum, after which biotinylated FDC-M1 mAb was

dc_1678_19

added. The biotinylated mAb was detected using streptavidin-PE.

Flow Cytometry

The spleens from newborn and young adult mice and lymph node cells from young adults were obtained by crushing the organs between the frosted ends of two microscopy slides, filtered, and washed in PBS containing 0.1% BSA and Na-azide. The cellular debris was eliminated by filtering the suspension through a 70-μm cell strainer (Becton–Dickinson, CA). The two-color immunofluorescence labeling was performed by incubating the cells with unlabeled mAb against CD21/35 or CD16/32 or CD43 or Ter-119 antigen followed by FITC-conjugated sheep anti-rat IgG or isotype-matched controls on ice. Following the saturation of residual binding sites of anti-rat Ig antibodies with normal rat serum, the cells were incubated with PE-conjugated rat anti-mouse CD45R. After washing in PBS–BSA buffer, the cells were fixed in 1% buffered paraformaldehyde. Flow cytometric data were obtained with a Becton–Dickinson FACScan equipped with an He-Ne laser and were analyzed using the CellQuest program.

RESULTS

Appearance and Distribution of Cells with FDC-Associated Markers

The functional definition of FDCs is based on their ability to localize the antigen in immune complex form on their dendrites. In addition to these receptor molecules that are necessary for this function, FDCs also display several phenotypic markers that further assist in their identification. In view of the paucity of relevant data, we investigated the temporal kinetics of the appearance of FDC-restricted differentiation markers FDC-M1 and FDC-M2 *in situ* with their ability to retain antigen in the neonatal spleen.

The immunohistological findings showed that the first FDC-associated marker expressed was the FDC-M1 antigen. Cells expressing this antigen appeared at day 3 (Fig. 1A). At this stage the reactivity appeared as a weakly stained rim at the periphery of developing white pulp, which overwhelmingly consisted of B cells (as shown by B220 labeling) surrounding the artery (Fig. 1B).

By D5 the FDC-M1 staining was more clearly defined, identifying some densely labeled cells around the edge of the white pulp, while the diffusely stained rim was also detectable. There were no cells expressing other FDC markers present at that time (Fig. 1C).

By D7 a clustering of some of the FDC-M1-positive cells could be observed. In addition to the FDC-M1-positive cells, a few follicle-like lymphocyte accumulations also contained groups of cells that displayed CR1.2 antigen. By comparing the coexpression of FDC-M1 and CR1.2 antigens in serial sections we found that at this time point fewer than 10% of the FDC-M1 clusters contained CR1.2-positive cells. These cells were arranged in a distribution that was similar to the adult-type pattern of the FDC network. By immunohistochemical procedures there were no CR1.2-positive cells detectable in extrafollicular locations (Fig. 1D).

By D10, a few follicles were also found to contain cells expressing FDC-M2 antigen, an epitope related to mouse C4 (Marie Kosco-Vilbois, personal communication), in both follicular and perivascular locations (Fig. 1E). In addition, the previously weak CR1.2 expression became noticeably stronger. We also observed that around 35% of FDC-M1-positive clusters were labeled with CR1.2 mAb and approximately 25% of these expressed the FDC-M2 marker.

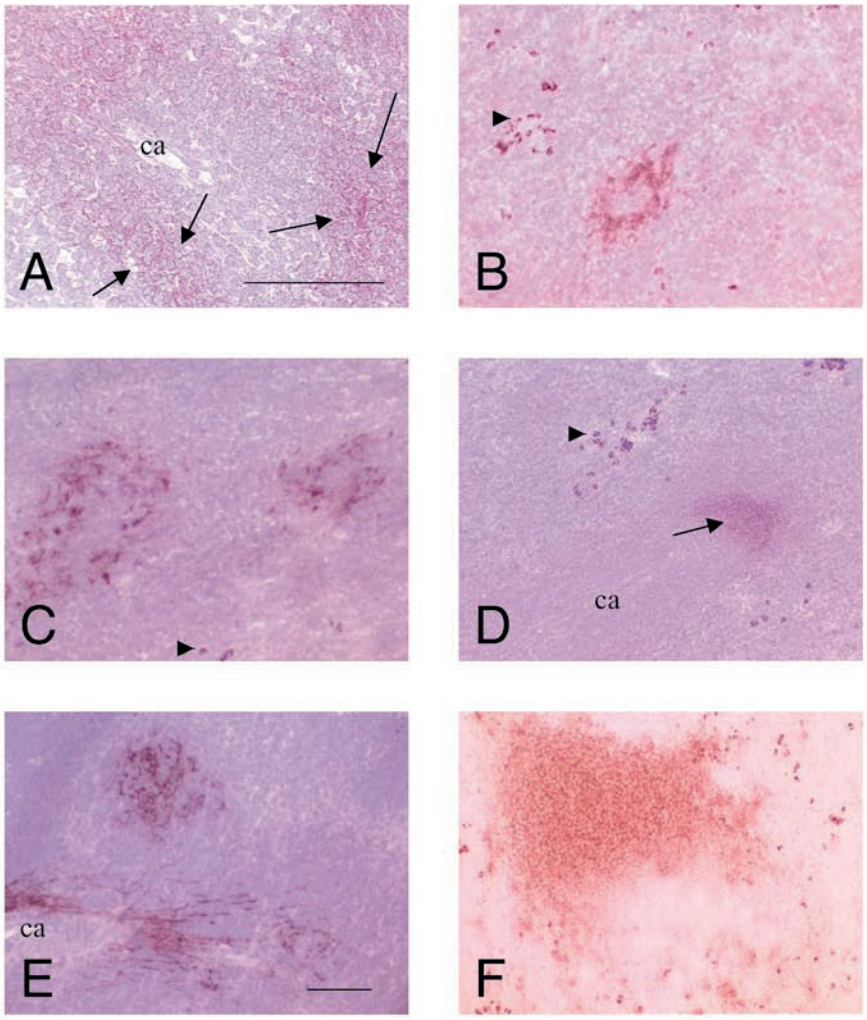
By day 14, an adult-type labeling pattern could be observed, with occasional follicles that also contained FcγRII (CD16/32)-expressing cells (Fig. 1F). The kinetics of the expression (appearance and distribution) of antigenic determinants associated with the FDC lineage are summarized in Table 1.

The differential labeling pattern of FDC precursors with FDC-M1 and anti-CR1/2 mAbs at Day 7 prompted us to investigate the relationship between the expressions of these markers by individual follicular cells. In the follicular clusters we found a substantial overlapping between the CR1/2 and FDC-M1 labeling. However, a considerable number of FDC-M1 single positive cells could be observed outside the follicular (but also in a B-cell rich) area (Fig. 2).

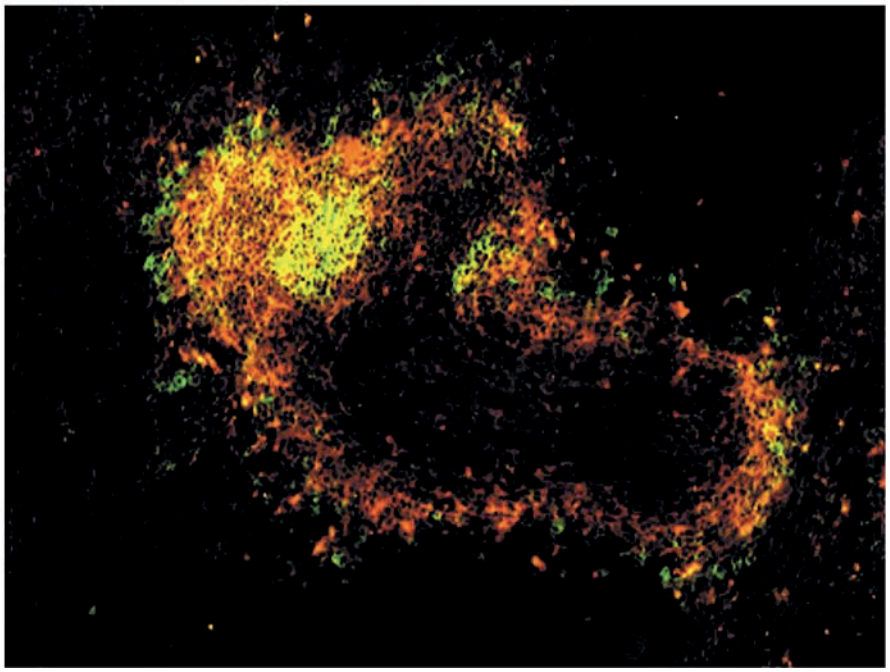
Differential Expression of CR1.2 and FcγRII Expression by Developing FDCs and Neonatal B Cells

Due to the expression of CR1.2 being limited to follicular dendritic and B cells, we performed a flow cytometric analysis to determine the identity of CR1.2-positive cells. Adult lymph node cells as a reference for comparison with fully mature B cells were also included. According to the flow cytometric data (Fig. 3), most of the B cells in D7 spleen were CR1.2 negative, thus indicating that the majority of histologically detectable CR1.2 antigen was unlikely to be B-cell-associated. It also indicates that the (immunohistologically detectable) high-level expression of CR1.2 by FDCs precedes its appearance on the majority of neonatal splenic B cells. However, our immunofluorescent studies revealed a few CR1.2-positive cells at the edge of white pulp (Fig. 2.) The labeling of these cells with B220 mAb indicated that the presence of these B cells presumably reflects the early formation of the marginal zone ($CD21^{hi}/CD23^{low}$) B cell compartment (23) (data not shown). On the other hand, the CD16/32 on neonatal B cells was displayed at the same intensity as

dc_1678_19



1



2

dc_1678_19

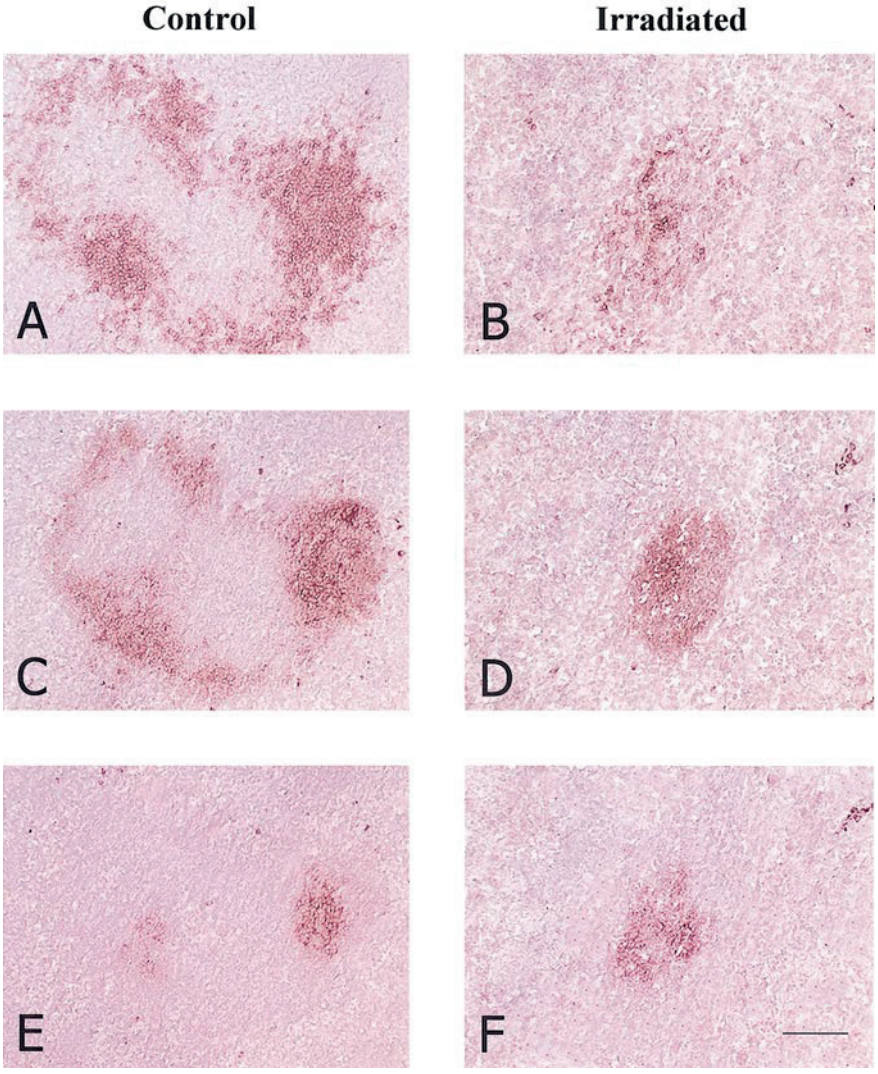


FIG. 4. Radiation-resistant formation of FDCs in neonatal spleen. Following irradiation at 750 rad on D3 (prior to the expression of FDC-M1- and CR1.2-positive cells), the spleens were removed at D10. The adjacent sections were reacted with anti-B220 (A and B), FDC-M1 (C and D), and CR1/2 (E and F) mAbs (hematoxylin counterstain; bar size in F corresponds to 100 μm). The pictures show representative results of three independent experiments, employing 6–10 newborn mice each.

mature lymph node B cells, whereas the histologically detectable expression of these receptors by FDCs occurred considerably later. Moreover, the dominance of Ter-119-positive erythroid elements points to extensive hemopoietic activity within the newborn spleen, which contrasts with adult tissue, where the size of the erythroid cell population was considerably reduced.

Radiation Resistance of FDC Precursor Maturation

Previous reports have established that resistance of *mature* FDCs to γ-irradiation exceeds the lethal dose (11). To test whether the sequence of appearance of various FDC-associated antigens is influenced by irradiation, newborn mice at D3 (when there was only

FIG. 1. Appearance and distribution of FDC-associated markers in postnatal murine spleen. Distribution of FDC-M1 (A)- and B220 (B)-positive cells on D3; FDC-M1 expression on D5 (C); CR1.2 expression on D7 (D); follicular and perivascular expression of FDC-M2 on D10 (E); follicular expression of CD16/32 on D14 (F). In A, D, and E arteries (ca) are indicated; arrows in A and D indicate labeling with FDC-M1 and anti-CR1.2 mAbs, respectively. In B, C, and D arrowheads point to a cluster of endogenous peroxidase-positive cells [hematoxylin counterstain (except F); bar size in A and E corresponds to 100 μm].

FIG. 2. Dual fluorescent labeling of D7 spleen with FDC-M1 (green) and CR1.2 (red) mAbs. The double positive follicular dendritic cells in the follicle appear as a yellow network.

dc_1678_19

TABLE 1
Appearance and Cellular Distribution FDC-Associated Markers in the Postnatal Murine Spleen

Day	Marker	Expression/location
3	FDC-M1	A diffuse rim around the edge of developing white pulp without cellular definition
5	FDC-M1	Individual cells scattered around the edge of white pulp
7	FDC-M1	Individual cells around the periphery of white pulp, and some loose clustered cells
	CR1.2	Few clustered cells in "follicular" arrangement
10	CR1.2	Expanded follicular staining with more follicles containing CR1.2-positive cells
	FDC-M2	A few follicles with CR1.2 expressing cells; intense reaction with perivascular reticular structures
14	FDC-M2	More numerous and dense follicular staining
	CD16/32	Some increased reticular staining in follicular location (in addition to the red pulp staining)

weak expression of FDC-M1 antigen, prior to any other FDC-associated marker being displayed) were irradiated at 750 rad, followed by immunohistochemical analysis of the spleen at D10. The irradiation resulted in a substantial loss of the B cell pool. The degree of elimination was determined using BioQuant quantitative morphometry, which revealed an over 90% reduction in B220-positive area in irradiated samples compared to that for age-matched controls. Despite this considerable reduction of the B cell compartment, the acquisition and tissue distribution of FDC-specific marker FDC-M1 and CR1.2 antigens progressed in a way similar to that in the nonirradiated controls (Fig. 4). In a contrast to the near-complete elimination of the B220-positive region, the difference between irradiated and control samples was less than 15% with regard to the area identified with either the FDC-M1 or anti-CR1.2 mAbs. Consistently with the untreated controls, the expression of both the FDC-M1 antigen and CR1.2 receptors at D10 in irradiated mice was much more pronounced than the sparse labeling of FDC-M2. Moreover, the data indicate that the differentiation of FDCs takes place even in an environment containing a substantially reduced B cell population, which population at this age is immature, even in untreated animals [ref. 12 and Fig. 3].

Antigen Trapping in Newborn Splenic FDCs

The fundamental hallmark of FDCs is the binding and long-term retention of antigen on their surface in an immune complex form (1–4). In order to demonstrate that the cells displaying the FDC-M1 and CR1.2 markers are functional FDCs, antigen localization was performed by HRP challenge of passively immunized newborn mice with anti-HRP antibodies at day 7. After

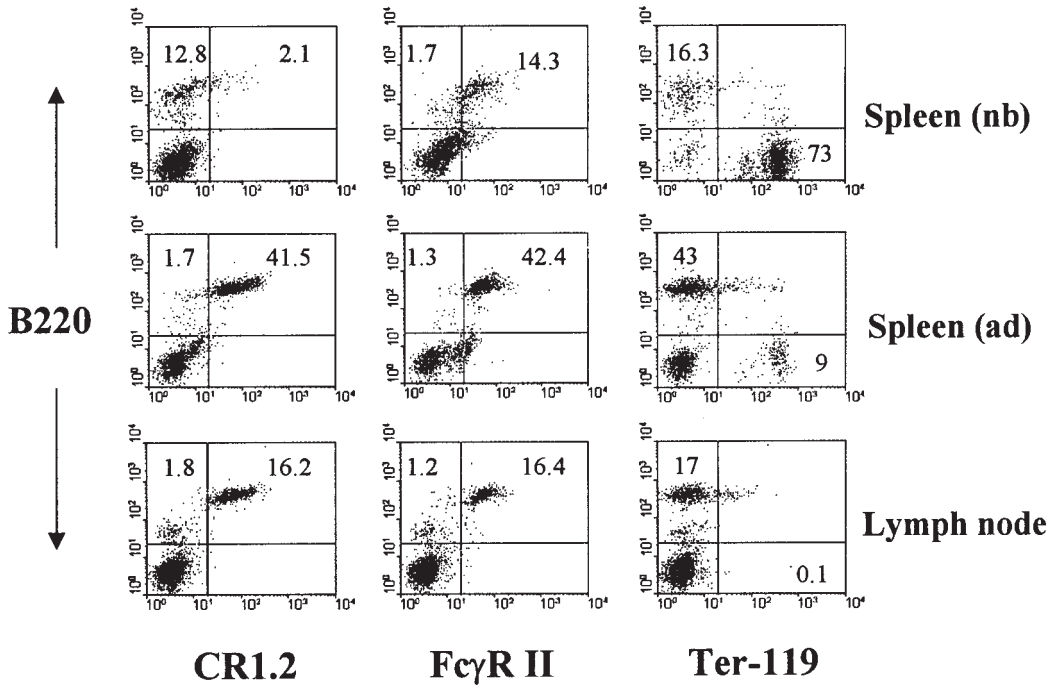


FIG. 3. Flow cytometric analysis of the cellular composition and the expression of immune complex binding receptors on splenic B cells from D7 neonates and adults, compared to adult lymph node. B cells (identified as B220-positive cells) were reacted with anti-CR1.2 and anti-CD 16/32 mAbs. The numbers in the top left and top right quadrants indicate the relative frequencies of the B220-only and double positive cell fractions, respectively. The date are representative of three independent analyses.

dc_1678_19

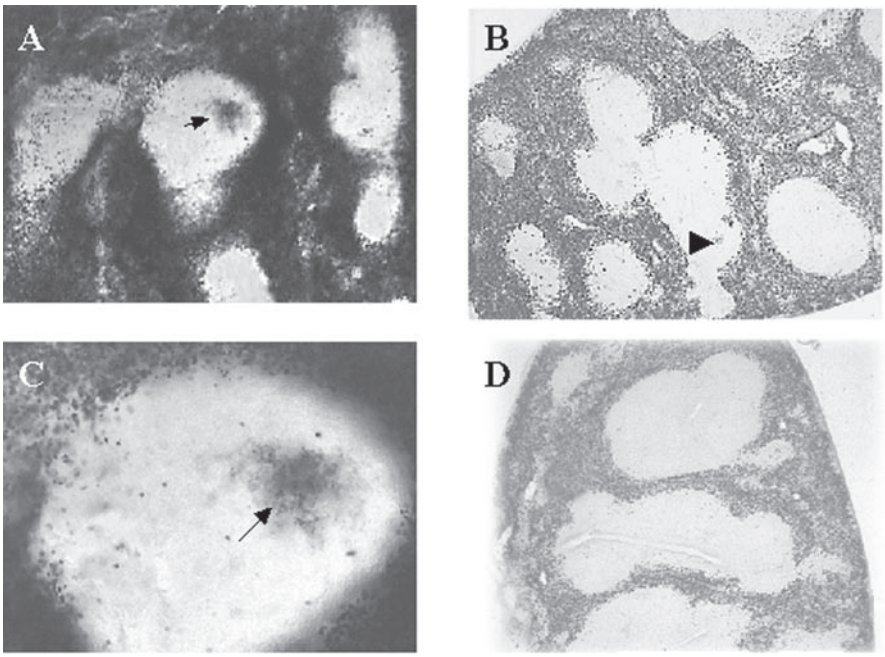


FIG. 5. Immune complex retention on splenic FDCs. Mice were injected with polyclonal anti-HRP on D6 (A, C) or D3 (B), followed by the administration of HRP. One week later the animals were perfused, and vibratome sections were developed for HRP activity. The positive area in A is shown at a higher magnification in C, with arrows pointing to the same antigen retaining reticulum in both panels. Note the extensive reticular positivity of FDCs contrasted with the lack of reactivity in B, where the arrowhead points to a cluster of cells containing endogenous peroxidase producing an intense granular reactivity. D shows a splenic section from a mouse that received only HRP at D7 as a negative control and was sacrificed a week later.

a 1-week period, the mice were perfused and the injected antigen was localized by its peroxidase activity. In a striking similarity to the histologically detectable expression of CR1.2 receptor, antigen retaining reticula of various sizes and intensities were observed (Fig. 5) within the white pulp, indicating that at least some of the cells displaying FDC-associated markers are functional FDCs. Antigen retention appeared to be variable in size and extent, in a manner similar to the tissue distribution of CR1.2 at D7. It indicates a gradual progress of CR1.2 acquisition at different locations. At this stage (at D14), the expression of FcγRII is weak and sparse in most of the follicles, which indicates that the CR1.2 receptors in newborns—similarly to mice with disrupted Fcγ receptor functions (24)—were sufficient to bind an HRP immune complex (at D7). The presence of various peroxidase containing cells in the red pulp and developing marginal zone did not permit us to delineate precisely whether the FDC-M1-positive cells in the periphery of white pulp could bind the immune complex on their surface.

In order to confirm that long-term immune complex binding requires at least the CR1.2 receptors by FDC precursors, D2 newborn mice (without any detectable CR1.2 expression) were passively immunized for HRP and challenged with the administration of antigen at D3. Apart from a few sparse cells found in the white pulp during the histochemical evaluation of spleen a week later, there was no evidence for the formation of antigen retaining reticulum. This lack of the development of antigen retaining reticulum prior to the expression of CR1.2 further confirms the need for CR1.2 in long-term antigen capture and retention by FDC precursors. The complete removal of immune complex from the circulation takes several days. However, the lack of detectable HRP activity in the latter group (despite the last 3 days overlap period between the appearance of CR1.2 on postnatal D7 and the termination of the experiment at D10) suggests that by that period the majority of the circulating immune complex had already been eliminated. This clearance was probably mediated by Fc receptors already present on lymphoid and myeloid cells.

DISCUSSION

The FDCs represent a unique cell population restricted to the follicles of secondary lymphoid tissues. While their role in the alternative antigen transport pathway (13) and the long-term maintenance of humoral immunity is appreciated, their differentiation and the development of the FDC network are less well known. Our aim was to study their phenotype during differentiation and their distribution by immunohistochemical methods and *in vivo* functional tests in the mouse postnatal spleen. The spleen at birth constitutes

dc_1678_19

not only a major part of the peripheral lymphoid tissue, but it also still functions as a partial hemopoietic organ. Its lymphoid compartment is substantially different from its adult counterpart (12, 14). Our data indicate that the differentiation of FDCs in the spleen takes place significantly earlier than in other lymphoid structures (15), and this process can be closely followed by the phenotypic analysis of the sequence of expression of FDC-associated cell surface markers.

Examining lineage-restricted markers (FDC-M1 and FDC-M2), we found that the FDC-M1 antibody reacts with some individual cells around the periphery of developing white pulp as early as D3. These FDC-M1-positive cells were in a B-cell-rich environment, without the B cells forming follicles. These B cells have been reported to be mostly immature lymphocytes and may have equally been produced from local or external (hepatic or bone marrow) precursors (12).

Unlike to the random distribution of FDC-M1-positive cells at D5, the acquisition of CR1.2 marker at D7 clearly coincided with the focal distribution of the expressing cells within the B-cell-rich regions. This finding is in agreement with that reported by others (15, 16) (namely, that the appearance of nonlymphoid cells expressing function-related FDC markers is limited to the follicles). According to our double label immunofluorescence, the majority of these cells have also retained their FDC-M1 expression, whereas the FDC-M1 single positive cells were excluded from the "primordial" follicles. The regional difference in the localization of FDC-M1 single positive and FDC-M1/CR1.2 double positive cells may indicate that the acquisition of function-related markers on putative FDC precursors is spatially restricted to developing follicles. Alternatively, only double positive cells migrate to form an FDC network. This second idea may be supported by the apparent pathway formed by double positive cells from the periphery of the white pulp extending into the double positive FDC network (see Fig. 3), which migratory event appears to be regulated by TNF signaling (21, 22). The appearance of CR1.2 on cells destined to become FDCs may be brought about by the maturation of a locally differentiated FDC-M1-positive cell population upon their encounter with B cells. The interaction between the two cell types may subsequently induce the upregulation of the CD21 gene through chromosomal alteration mediated by histone deacetylation (17), resulting in two products of alternative splicing (CD35 and CD21). In our studies we used an antibody against a common epitope shared by these structures. Of these, the CR2 component is reported to be detectable prior to CR1 during development (18). However, we found that the expression of CR1.2 on FDCs in the spleen is already detectable at the end of first week of postnatal life, somewhat earlier than previously reported (18). The early appearance of FDC-M1 and CR1.2 molecules indicates that the B cells providing the necessary signals for FDC maturation need not be fully differentiated, as the splenic B lymphocytes at this stage are overwhelmingly Type 1 transitional B cells (12).

Subsequent to the appearance of CR1.2, the FDC-M2 antigen became detectable. Similarly to the CR1.2, it was also restricted to the "primordial" follicles. Unlike CR1.2, however, this marker was also found in some perivascular connective tissue elements, mostly forming a thick reticular pattern. The recent identification of the FDC-M2 antigen as the mouse C4 complement component (Marie Kosco-Vilbois, personal communication) indicates that the expression of CR1.2 on FDCs is rapidly followed by its utilization subsequent to complement activation. This likely occurs as a consequence of immune complex trapping. Trapping by D7 FDCs was documented by using passive immunization and challenge with HRP, which indicates a much earlier period that has been reported (19, 20). The discrepancy may be explained by the differences between using immunizing procedures (active immunization with flagellin vs passive immunization with preformed antibodies), phylogenetic traits between rats and mice, or developmental differences between spleen and lymph nodes.

The FDCs have also proved to be highly radioresistant, thus prompting us to investigate the effect of high-dose irradiation on the sequential appearance of FDC-associated markers. Despite the marked reduction of B cells and other hemopoietic elements, the acquisition of CR1.2 and, to a lesser degree, the FDC-M2 markers following the irradiation of newborn animals appeared to progress at the same pace as that in untreated controls. The lack of any noticeable delay in the differentiation of FDCs indicates that the FDC precursors are unlikely to proliferate. Moreover, their localization pattern did not appear to have been influenced by the depletion of the overwhelming majority of B cells. Therefore, it appears that there is a certain "window" of development when FDC precursors need to be exposed to differentiating stimuli. Once these signals are received, the FDC precursors will undergo their programmed maturation, irrespective of their radiation-altered environment. The alternative explanation for the FDC precursor maturation following irradiation is that the few remaining B cells might be sufficient for continuing to provide the necessary stimuli.

The retention of an immune complex by FDC-M1-positive/CR1.2-positive cells demonstrated that these cells could indeed function as FDCs. Despite the absence of detectable CD16/32 expression in splenic follicular tissue locations the expression of CR1.2 as early as D7 could confer the retention of antigen (HRP) in white pulp foci. The presence of a structure capable of mediating long-term antigen retention on putative FDC precursors within the developing follicles may

dc_1678_19

represent a significant contribution to the newborn's ability to mount an effective humoral immune response. This would promote the formation of long-term plasma cells, despite the markedly underdeveloped T cell compartment and T cell functions and the bone marrow's as yet immature support function (14). The persistence of an immune complex on these cells indicates that these cells fulfill the functional requirements of FDCs, despite their partially complete FDC phenotype.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by National Institutes of Health Grant AG-17063 awarded to A.K.S.

REFERENCES

1. Tew, J. G., Kosco, M. H., Burton, G. F., and Szakal, A. K., Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* **117,** 185–211, 1990.
2. Hanna, M. G., and Szakal, A. K., Localization of ^{125}I-labeled antigen in germinal centers of mouse spleen: histologic and ultrastructural autoradiographic studies of the secondary immune reaction. *J. Immunol.* **101,** 949–962, 1968.
3. Schriever, F., and Nadler, L. M., The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Adv. Immunol.* **51,** 243–284, 1992.
4. Van den Berg, T. K., Yoshida, K., and Dijkstra, C. D., Mechanism of immune complex trapping by follicular dendritic cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **201,** 49–67, 1995.
5. MacLennan, I. C., Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* **12,** 117–139, 1994.
6. Tew, J. G., Wu, J., Fakher, M., Szakal, A. K., and Qin, D., Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. *Trends Immunol.* **22,** 361–367, 2001.
7. Endres, R., Alimzhanov, M. B., Plitz, T., Futterer, A., Kosco-Vilbois, M. H., Nedospasov, S. A., Rajewsky, K., and Pfeffer, K., Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. *J. Exp. Med.* **189,** 159–168, 1999.
8. Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Forster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M., and Cyster, J. G., A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* **406,** 309–314, 2000.
9. Kapasi, Z. F., Burton, G. F., Shultz, L. D., Tew, J. G., and Szakal, A. K., Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues. *J. Immunol.* **160,** 1078–1084, 1998.
10. Balázs, M., Grama, L., and Balogh, P., Detection of phenotypic heterogeneity within the murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies IBL-7/1 and IBL-7/22. *Hybridoma* **18,** 177–182, 1999.
11. Qin, D., Wu, J., Vora, K. A., Ravetch, J. V., Szakal, A. K., Manser, T., and Tew, J. G., Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. *J. Immunol.* **164,** 6268–6275, 2000.
12. Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C., and Carsetti, R., B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* **190,** 75–89, 1999.
13. Szakal, A. K., Kosco, M. H., and Tew, J. G., A novel in vivo follicular dendritic cell-dependent iccosome-mediated mechanism for delivery of antigen to antigen-processing cells. *J. Immunol.* **140,** 341–353, 1988.
14. Pihlgren, M., Schallert, N., Tougne, C., Bozzotti, P., Kovarik, J., Fulurija, A., Kosco-Vilbois, M. H., Lambert, P. H., and Siegrist, C. A., Delayed and deficient establishment of the long-term bone marrow plasma cell pool during early life. *Eur. J. Immunol.* **31,** 939–946, 2001.
15. van Rees, E. P., Dopp, E. A., Dijkstra, C. D., and Sminia, T., The postnatal development of cell populations in the rat popliteal lymph node. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* **242,** 391–398, 1985.
16. Kroese, F. G., Wubbena, A. S., Kuijpers, K. C., and Nieuwenhuis, P., The ontogeny of germinal centre forming capacity of neonatal rat spleen. *Immunology* **60,** 597–602, 1987.
17. Zabel, M. D., and Weiss, J. H., Cell-specific regulation of the CD21 gene. *Int. Immunopharmacol.* **1,** 483–493, 2001.
18. Hoshi, H., Horie, K., Tanaka, K., Nagata, H., Aizawa, S., Hiramoto, M., Ryouke, T., and Aijima, H., Patterns of age-dependent changes in the numbers of lymph follicles and germinal centres in somatic and mesenteric lymph nodes in growing C57B1/6 mice. *J. Anat.* **198,** 189–205, 2001.
19. Williams, G. M., and Nossal, G. J., Ontogeny of the immune response. I. The development of the follicular antigen-trapping mechanism. *J. Exp. Med.* **24,** 47–56, 1966.
20. Holmes, K. L., Schnizlein, C. T., Perkins, E. H., and Tew, J. G., The effect of age on antigen retention in lymphoid follicles and in collagenous tissue of mice. *Mech. Ageing Dev.* **25,** 243–255, 1984.
21. Pasparakis, M., Kousteni, S., Peschon, J., and Kollias, G., Tumor necrosis factor and the p55TNF receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precursors into splenic follicles. *Cell Immunol.* **201,** 33–41, 2000.
22. Mandik-Nayak, L., Huang, G., Sheehan, K. C., Erikson, J., and Chaplin, D. D., Signaling through TNF receptor p55 in TNF-alpha-deficient mice alters the CXCL13/CCL19/CCL21 ratio in the spleen and induces maturation and migration of anergic B Cells into the B cell follicle. *J. Immunol.* **167,** 1920–1928, 2001.
23. Oliver, A. M., Martin, F., Gartland, G. L., Carter, R. H., and Kearney, J. F., Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur. J. Immunol.* **27,** 2366–2374, 1997.
24. Vora, K. A., Ravetch, J. V., and Manser T., Amplified follicular immune complex deposition in mice lacking the Fc receptor gamma-chain does not alter maturation of the B cell response. *J. Immunol.* **159,** 2116, 1997.

dc_1678_19

dc_1678_19

THE ANATOMICAL RECORD 268:160–168 (2002)

Appearance and Phenotype of Murine Follicular Dendritic Cells Expressing VCAM-1

PÉTER BALOGH,[1] YÜKSEL AYDAR,[1] JOHN G. TEW,[2] AND ANDRAS K. SZAKAL[1]*

[1]Immunology Group, Department of Anatomy and Neurobiology, Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia

[2]Department of Microbiology and Immunology, Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia

ABSTRACT

The architecture of lymphoid follicles is determined by a series of interactions between lymphoid and follicular stromal cells. A cardinal population in the non-lymphoid compartment is the follicular dendritic cell (FDC), whose communication with resting and activated B cells involves various adhesive interactions. The FDC phenotype variably includes the display of vascular cell adhesion molecule (VCAM-1). In this report we investigated the appearance and follicular tissue distribution of VCAM-1 in murine peripheral lymphoid tissues, and compared VCAM-1 with other FDC markers using immunohistochemistry. Correlating the appearance of VCAM-1 with other murine FDC-associated markers (CR1.2 [complement receptor 1.2 or CD35/21] and FDC-M1) revealed that the display of VCAM-1 is restricted to a subset of CR1.2-positive FDCs. We found that the expression of VCAM-1 antigen in the spleen or peripheral lymph nodes on FDCs requires antigenic stimulus, and that it coincides with germinal center formation. The VCAM-1 expression is associated with the appearance of mucosal addressin cell adhesion molecule (MAdCAM-1), with some slight differences in occurrence. The appearance of VCAM-1 and MAdCAM-1 antigens on FDCs may serve as indicators of FDC activation. Anat Rec 268: 160–168, 2002. © 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key words: follicular dendritic cells; germinal center; VCAM-1; immunohistochemistry

The function of FDCs is to establish a suitable microenvironment to support the expansion and affinity maturation of centroblasts, where the B cell receptor (BCR) of antigen-stimulated B cells is engaged by immune complexes displayed on the surface of FDC processes and iccosomes (Tew et al., 2001). In addition to complement- and Fcγ receptors that are involved in the retention of these immune complexes, FDCs also need to express an array of adhesion molecules whose function is to strengthen the physical contact between germinal center B cells and FDCs. In recent human studies, the VCAM-1 molecule was implicated as a crucial FDC-associated adhesion receptor for the efficient binding of centroblasts through their VLA-4 integrin as ligand (Freedman et al., 1990; Koopman et al., 1991). Furthermore, the adhesion of centroblasts to FDCs through ICAM-1-LFA-1 and VCAM-1-VLA-4 pathways helps prevent their apoptosis (Koopman et al., 1994, 1997) and promote their clustering (Kosco et al., 1992). The sources of human follicular dendritic cells in these studies (in situ or in vitro) are usually

Grant sponsor: National Institutes of Health, NIA; Grant number: AG-17063.

*Correspondence to: Andras K. Szakal, Department of Anatomy and Neurobiology, MCV VCU, P.O. Box 980709, Richmond, VA 23298. Fax: (804) 828-9477. E-mail: aszakal@hsc.vcu.edu

Péter Balogh's present address is: Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, H-7643 Pécs, Hungary.

Received 28 March 2002; Accepted 28 June 2002

DOI 10.1002/ar.10148

© 2002 WILEY-LISS, INC.

dc_1678_19

peripheral lymphoid tissues undergoing inflammatory processes or malignancy (Ruco et al., 1992; Huang et al., 1995).

In mice, the inactivation of the VCAM-1 gene has led to embryonic lethality, indicating the importance of this molecule in placental and cardiovascular differentiation, predating its eventual role in immune responses (Gurtner et al., 1995; Kwee et al., 1995). During the ontogeny of murine hemopoietic cells in the bone marrow, the VCAM-1 molecule may serve both as a homing receptor on sinus endothelium, and as an adhesion molecule on stromal cells (Simmons et al., 1992; Papayannopoulou et al., 1995). At these locations the VCAM-1 antigen is constitutively expressed (Jacobsen et al., 1996).

Our previous studies on the ontogeny of splenic FDCs (Balogh et al., 2001) prompted us to hypothesize that VCAM-1 is not constitutively expressed on FDC, and that its expression is associated with germinal center formation. If this hypothesis is correct, discrepancies in the literature relative to expression of VCAM-1 on FDCs likely relate to whether the FDCs were activated as a consequence of antigenic stimulation. As there is no comprehensive report describing the location and phenotypic characteristics of VCAM-1-positive FDCs in the mouse, we chose to define these in several murine peripheral lymphoid tissues. We found that the VCAM-1 expression on FDCs is restricted to a portion of CR1.2-positive cells in the FDC network, and that VCAM-1 expression on FDCs requires stimulation of lymphocytes and germinal center formation. Most of the VCAM-1 positive FDCs appear to coexpress MAdCAM-1 antigen, but with some slight differences in the labeling pattern. The inducibility of VCAM-1 on a subset of FDCs underlines the further specialization and dynamic nature of the FDC phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Young adult BALB/c mice were purchased from Harlan (Indianapolis, IN) and maintained under SPF conditions. The mice were immunized with 0.2 ml 20% washed sheep erythrocyte (SRBC) suspension in PBS intraperitoneally, or for draining lymph nodes with 25 μl alum-precipitated ovalbumin (OVA) containing *B. pertussis* subcutaneously in the legs. The animals were fed rodent chow, given water ad libitum, and were handled in accordance with the approved IACUC protocol.

Antibodies and Other Reagents

The rat monoclonal antibodies (mAbs) against mouse CR1.2 (clone 7G8), VCAM-1 (clone 426), and MAdCAM-1 (clone MECA-89) were obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA). The FDC-M1 and FDC-M2 hybridoma cell lines were generously provided by Dr. Marie Kosco-Vilbois (Serono, Switzerland), and their supernatants were used as primary antibody. The hybridoma MK-1 was used as the source for rat anti-mouse ICAM-1 mAb (Maeda et al., 1995). In immunohistochemistry, the binding of rat mAbs was detected by biotinylated mouse anti-rat kappa chain mAb (MRK-1) from BD Pharmingen. The Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat IgG was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). The peanut agglutinin lectin conjugated with peroxidase (PNA-HRP) and the streptavidin-alkaline phosphatase (AP) conjugate were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The enzymatic reaction was developed with a substrate solution containing nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) with levamisol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The biotinylated CD45R/B220 (clone RA3-6B2), anti-MAdCAM-1, and VCAM-1 mAbs were purchased from BD Pharmingen. In immunofluorescence and flow cytometry, the binding of biotinylated antibodies was detected with streptavidin-phycoerythrin (BD Pharmingen).

Immunohistochemistry and Lectin Histochemistry

At various periods within 10 days following i.p. immunization with SRBC, the spleens were removed and frozen in CryoForm embedding medium (IEC, Needham, MA). The regional lymph nodes were isolated 7 days after the secondary challenge with OVA, and 10-μm-thick cryostat sections were cut on a Leitz cryostat. Following acetone fixation for 10 min, the sections were allowed to dry and were stored frozen at –70°C. The immunohistochemical procedures were carried out as previously described (Balázs et al., 2001). Briefly, the sections were rehydrated and saturated with 10% bovine serum albumin (BSA), then incubated with unlabeled rat mAbs. The bound antibodies were detected using biotinylated mouse anti-rat kappa chain mAb followed by incubation with streptavidin-alkaline phosphatase conjugate. The reaction was visualized using NBT/BCIP in a 0.1 M Tris buffer, pH 9.5, containing 1 mg/ml levamisole.

The germinal center formation was determined by labeling the sections with PNA-HRP. The fixed sections were rehydrated and the endogenous peroxidase activity was quenched with incubation in PBS containing 0.1% (w/v) phenyl-hydrazine-HCl. After they were washed, the sections were saturated with 10% BSA and then incubated with PNA-HRP. The reaction was visualized using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) in a 0.1 M Na-acetate buffer containing 0.03% H_2O_2. The staining intensity and distribution of labeled cells in sections was quantitated using BioQuant Nova software (BIOQUANT-R&M Biometrics, Inc., Nashville, TN).

Isolation of Activated B Cells

Peyer's patches were collected and digested with an enzyme cocktail containing Collagenase D (Roche, IN) and DNAse I (Sigma) as previously described for FDC isolation (Qin et al., 2000). The cells were released with repeated gentle pipetting, then directly layered onto a continuous 50% Percoll gradient and centrifuged for 20 min at 700 *g*. The low-density (1.050–1.060 g/ml) fraction was then removed and washed twice, and used for flow cytometry.

The expression of VCAM-1 and MAdCAM-1 on in vitro activated cells was studied following the stimulation of spleen cells with LPS from *Salmonella typhimurium* (Sigma) at 10 μg/ml for various periods. Their surface phenotype for the adhesion receptors was investigated by flow cytometry.

Immunofluorescence and Flow Cytometry

Two-color immunofluorescent labeling of spleen sections was performed using various combinations of unlabeled (FDC-M1, FDC-M2, CR1.2, B220, and MAdCAM-1 specific) and biotinylated (anti-VCAM-1) rat mAbs against FDC and B cell markers and vascular adhesion molecules,

dc_1678_19

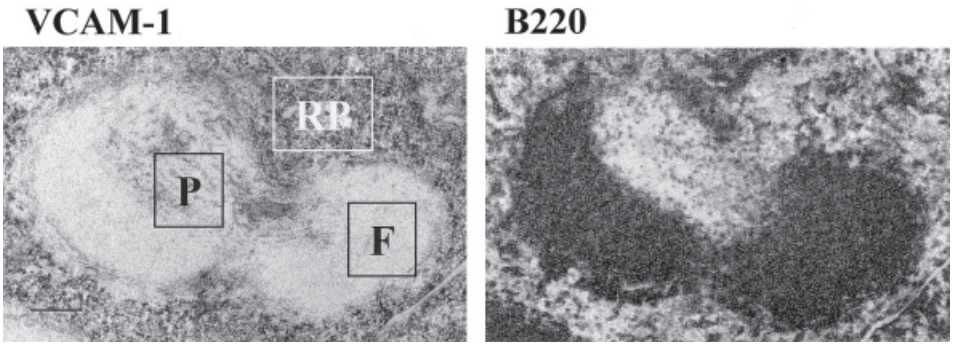


Fig. 1. Expression of VCAM-1 in mouse spleen. Tissue sections were labeled with VCAM-1 antibody. The various compartments of splenic white pulp (F, follicle; P, PALS) and red pulp (R) were identified using B220 labeling of adjacent section (top right panel). The size bar represents 250 μm.

respectively. After the sections were rehydrated in 10% BSA-PBS, the first incubation of sections with unlabeled rat mAb was followed by incubation with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat IgG. The remaining binding sites of this secondary antibody were saturated with normal rat serum, after which biotinylated rat mAb was added. The biotinylated mAb was detected using streptavidin-PE. Controls included biotinylated rat IgG in place of biotinylated mAbs. The immunofluorescent reaction of sections was observed using separate B-2A and G2E/C filter sets of a Nikon microscope for Alexa Fluor 488 and phycoerythrin fluorochromes, respectively, and the tissue staining was recorded with SPOT3.4 software (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI). The two-color staining of the sections was generated by overlapping the two different signals using Photoshop 6.0 software.

For flow cytometric analysis the spleen or lymph node cell suspensions from mice previously immunized with SRBC or OVA, respectively, and lymphocytes from Peyer's patches of young adult mice were obtained by crushing the organs between the frosted ends of two microscopy slides. The released cells were then filtered and washed in PBS containing 0.1% BSA and Na-azide. The cellular debris was eliminated by filtering the suspension through a 70-μm cell strainer (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Two-color immunofluorescence labeling was performed by incubating the cells with unlabeled mAb against VCAM-1, MAdCAM-1, and ICAM-1, followed by Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat IgG. Following the saturation of residual binding sites of anti-rat Ig antibodies with normal rat serum, the cells were incubated with PE-conjugated rat anti-mouse B220 mAb. After they were washed in PBS-BSA buffer, the cells were fixed in 1% buffered paraformaldehyde. For PNA and cell surface marker expression, the centroblast-enriched cells isolated from the Peyer's patches were incubated in a cocktail containing FITC-conjugated PNA (10 μg/ml), unlabeled 2.4G2 mAb for FcγRII blocking, and biotinylated anti-B220 or anti-MAdCAM-1 or anti-VCAM-1 mAbs, respectively, which were detected with streptavidin-PE. The results were compared to that obtained with biotinylated rat IgG. Flow cytometric data were obtained with a Becton-Dickinson FACScan equipped with an argon laser, and were analyzed using the CellQuest program.

RESULTS

Appearance of VCAM-1 Antigen on FDCs Requires Antigenic Stimulation

Without previous deliberate immunization, we could only observe a few scattered areas with VCAM-1 staining in the follicular regions of either the spleen or the peripheral (brachial, axillary, inguinal, and popliteal) lymph nodes. In unstimulated spleen, the periarteriolar lymphoid sheath (PALS) and the red pulp contained VCAM-1-positive cells (Fig. 1). These cells in the PALS had an elongated and often dendritic morphology, as previously described (Gao et al., 1997). The marginal sinus had a faint expression of VCAM-1. The various red pulp elements, including macrophages (Sadahira et al., 1995) and stromal cells (Castro et al., 1997), had the most intense immunoreactivity with the VCAM-1 antibody. The peripheral lymph nodes did not contain VCAM-1-positive cells in the B-cell zone without antigenic stimulation (results not shown).

The Peyer's patches contained several large PNA clusters, indicating intense cell proliferation as a consequence of constant exposure of B cells to alimentary and other external antigens. These clusters contained an extensive network of VCAM-1-positive cells, whose arrangement corresponded to that of FDC-M2-positive FDCs (Fig. 2).

The lack of VCAM-1-positive cells in resting follicles in spleen and lymph nodes, as opposed to PNA-positive germinal centers in Peyer's patches, prompted us to investigate the effect of immunization on the appearance of this molecule on FDCs at various time points following i.p. immunization with SRBC. We found that starting at around 5–7 days post-immunization, a strongly VCAM-1-positive network developed within the PNA-positive clusters of splenic and lymph node follicles. The location of VCAM-1-positive follicular cells corresponded to those displaying other FDC-associated molecules, such as the CR1.2 and FDC-M1 (Fig. 3).

To better assess VCAM-1 expression on germinal center B cells, we tested both PNA+ centrocytes and centroblasts, and resting B cells using flow cytometry. Neither the activated PNA+ germinal center B cells nor the residual PNA-resting lymphocytes were labeled for VCAM-1 (Fig. 4A and C). This contrasts with the expression pattern of another adhesion receptor, ICAM-1, which is

dc_1678_19

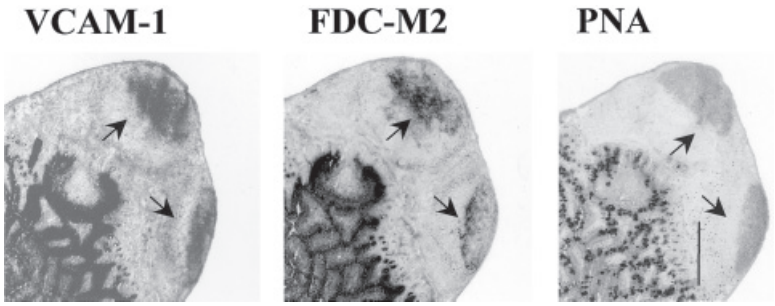


Fig. 2. Expression of VCAM-1 on Peyer's patches follicular dendritic cells. Adjacent sections were labeled with the antibodies as indicated. The germinal centers were identified using PNA. Arrows point to identical germinal centers. The pictures illustrate a representative result from three separate tissue labelings, each employing three to five mice. The bar size in the PNA panel represents 500 μm.

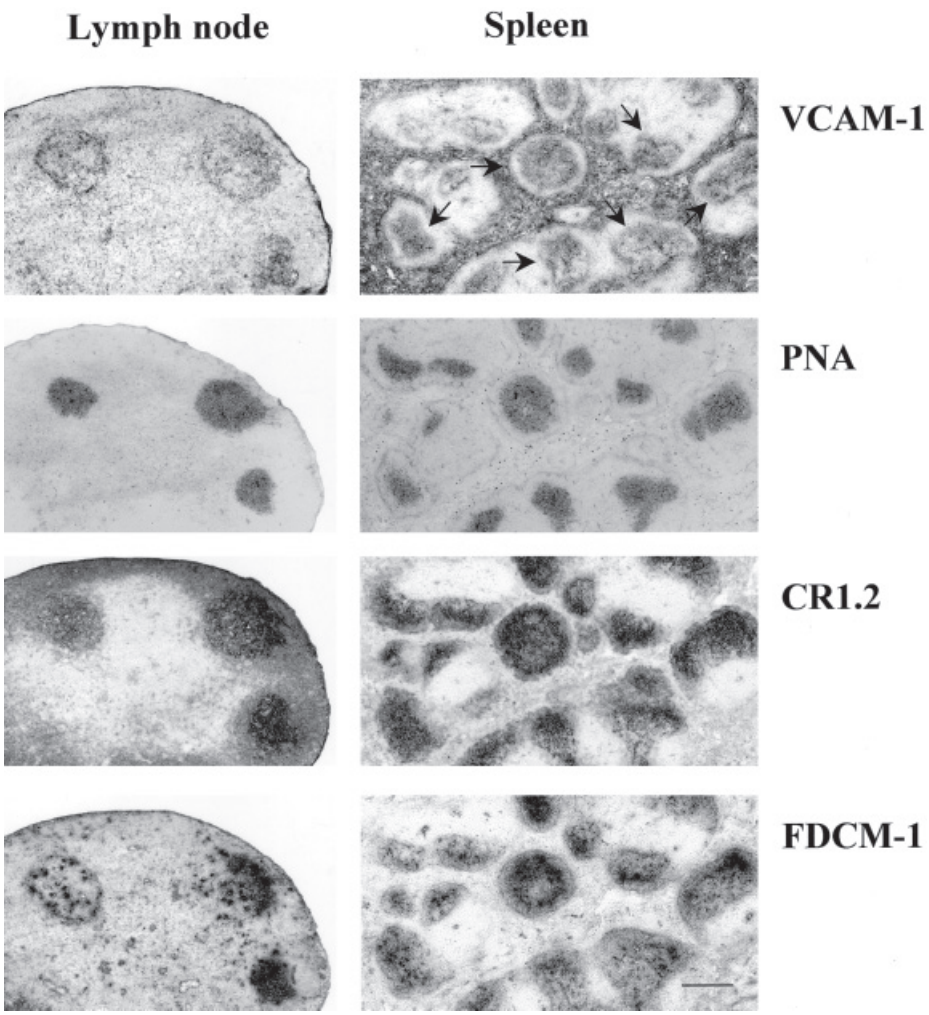


Fig. 3. Induction of VCAM-1 on FDCs in lymph nodes and spleen. Serial sections from spleens SRBC-immunized mice and lymph nodes from OVA-stimulated mice were labeled with the antibodies as indicated (10 and 7 days, respectively, after immunization). Arrows in the spleen section series point to identical germinal centers. Bar size corresponds to 500 μm.

dc_1678_19

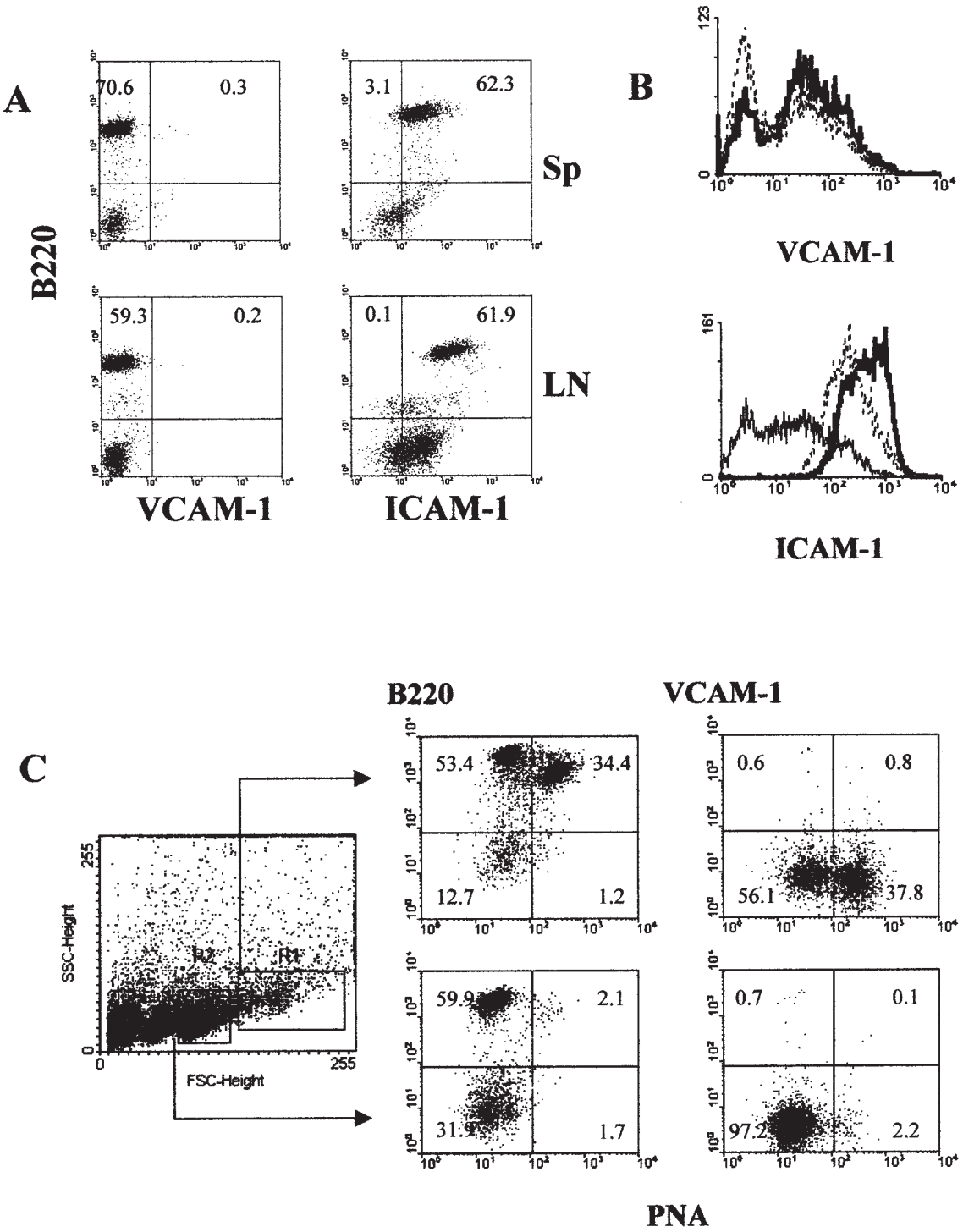


Fig. 4. Expression of VCAM-1 is restricted to non-lymphoid cells. **A:** Following antigenic stimulation, mechanically released lymphocytes (from spleen or lymph nodes) were reacted with anti-VCAM-1 mAb followed by Alexa Fluor 488 anti-rat IgG (X-axis). The B cells were identified using PE-conjugated anti-B220 (Y-axis). As a positive adhesion marker for B cells, anti-ICAM-1 antibody was used (right panels). **B:** LPS-stimulated B cells do not upregulate VCAM-1. Resting spleen lymphocytes were activated with LPS and labeled with anti-VCAM-1 or anti-ICAM-1 mAbs (FL1) and PE-anti-B220 mAb (FL2). The histogram overlays show the FL1 fluorescence of B220-positive cells with (bold) or without (dashed line) LPS after a 3-day culture period. The thin line on the ICAM-1 panel represents labeling with rat IgG isotype control. **C:** Light-density cells isolated from collagenase-treated Peyer's patches were resolved into two subsets (R1 and R2) based on their forward- and right-angle light scattering. The cell population with a larger size (R1) includes the PNA-positive centroblasts, which are overwhelmingly (B220-positive) B cells. The majority of the cells in the R2 window are PNA-negative. The numbers indicate the percentage of electronic events in the quadrants above background value, analyzing at least 10,000 cells (excluding dead cells and cellular debris). The graphs are representative of three independent analyses.

dc_1678_19

shared by both lymphocytes and FDCs, although the latter express ICAM-1 at a higher density (Maeda et al., 1995). We also found that ICAM-1 expression could be enhanced by activating B cells with LPS, but it did not induce the appearance of VCAM-1 (Fig. 4B). This indicates that these adhesion receptors are produced by cells other than B lymphocytes in germinal centers. In an attempt to confirm, using flow cytometry, that FDCs bear VCAM-1, we found a small double-positive subpopulation in an FDC-enriched cell sample. However, the relatively weak staining for FDC-M1 following the enzymatic treatment of lymphoid tissue during cell isolation did not allow us to determine precisely the size of this subset within the FDC pool.

Distinct Distribution of VCAM-1 and MAdCAM-1 Antigens on Stimulated Splenic FDCs

In addition to the induced appearance of VCAM-1 antigen, the FDCs in stimulated spleen also displayed the MAdCAM-1 antigen. The MAdCAM-1 molecule as a receptor for $\alpha 4\beta 7$ integrin expressed on recirculating lymphocytes is involved in their homing to the Peyer's patches (Berlin et al., 1993). Its expression in unstimulated spleen is restricted to the cells lining the marginal sinus (Kraal et al., 1995), a phenomenon of unknown significance. This MAdCAM-1 expression often appeared as a continuous reactivity in germinal centers (Fig. 5A) that originated from the marginal sinus and projected toward the PALS. Subsequent flow cytometric analysis confirmed that, similarly to VCAM-1, the MAdCAM-1 expression was also not associated with B cells (results not shown). In contrast to the follicular tissue expression of MAdCAM-1, the VCAM-1-positive germinal center compartment was typically surrounded by a 30–50-μm-thick VCAM-1 negative rim, and was thus separated from the marginal sinus (Fig. 5B). The double labeling of sections with MAdCAM-1 and VCAM-1 confirmed that in the spleen there is a MAdCAM-1-positive/VCAM-1-negative rim, which surrounds the double-positive region (Fig. 5C). The appearance of MAdCAM-1 and VCAM-1 antigens on splenic FDCs showed the same temporal kinetics, which started at around day 5 and were fully developed by day 7 following i.p. immunization with SRBC. These data indicate that unlike the continuous display of CR1.2 and lineage-restricted FDC-M1 antigens, the induction of expression of both the VCAM-1 and MAdCAM-1 molecules requires stimulation, and thus their presence on FDCs may indicate their activated state.

To define whether the appearance of VCAM-1 and MAdCAM-1 antigens is restricted to the early phase of germinal center formation, we tested their tissue expression well after the peak period of centroblast expansion. We found that both adhesion molecules remained detectable for at least as long as 28 days following immunization with SRBC. Similar to the reaction pattern observed between day 7 and day 10, their follicular expression was restricted to the PNA-positive compartment (Fig. 6).

Aged FDCs are known to have a reduced ability to support germinal center formation (Szakal et al., 1990). We found no difference in the kinetics of appearance and labeling intensity for either VCAM-1 or MAdCAM-1 antigens on splenic FDCs between young and old (>20 months of age) animals (not shown). Thus the impaired antigen retention represents a deficit of aged FDCs distinct from the ability to upregulate these adhesion receptors.

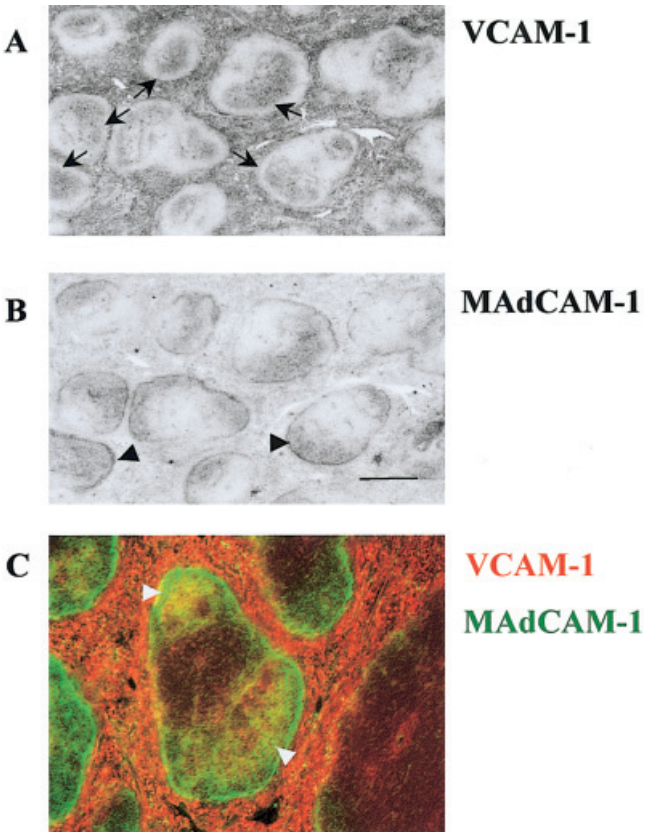


Fig. 5. Differences between the VCAM-1 and MAdCAM-1 distribution on splenic FDCs. Adjacent serial spleen sections from SRBC-stimulated mice were reacted with the antibodies as indicated. The arrows in the VCAM-1 panel point to unlabeled rims surrounding the VCAM-1-positive clusters (top). The arrowheads in the MAdCAM-1 panel identify the marginal sinus as origin of the continuous MAdCAM-1-positive compartment (middle). The arrowheads in the bottom panel point to the VCAM-1-negative/MAdCAM-1-positive region. Bar size = 500 μm.

Correlation of VCAM-1 Expression With Other FDC-Specific Markers

In mouse, the identification of FDCs in tissue sections requires their labeling with specific monoclonal antibodies against CR1.2 or other FDC-associated markers such as FDC-M1 and FDC-M2. While CR1.2 also binds weakly to B cells, the FDC-M1 antigen is also expressed by tingible body macrophages, and the FDC-M2 reactivity is due to the C4 complement component bound onto FDCs bearing immune complexes (Kosco-Vilbois, personal communication). We chose to use CR1.2 and FDC-M1 antibodies against these genuine FDC-derived markers as reference antibodies (Fig. 7). The double labeling of tissue sections with these mAbs and anti-VCAM-1 revealed that the VCAM-1 reactivity of FDCs is restricted to only a part of the entire CR1.2 network (excluding the B cells' reactivity). On the other hand, the peripheral segment of the follicles with germinal centers contained a CR1.2-negative/VCAM-1-positive zone between the follicles and T-cell zone in both the spleen and the lymph nodes. The FDC-M1 positive cells were evenly distributed across the VCAM-1-positive follicular region. The VCAM-positive FDCs also

dc_1678_19

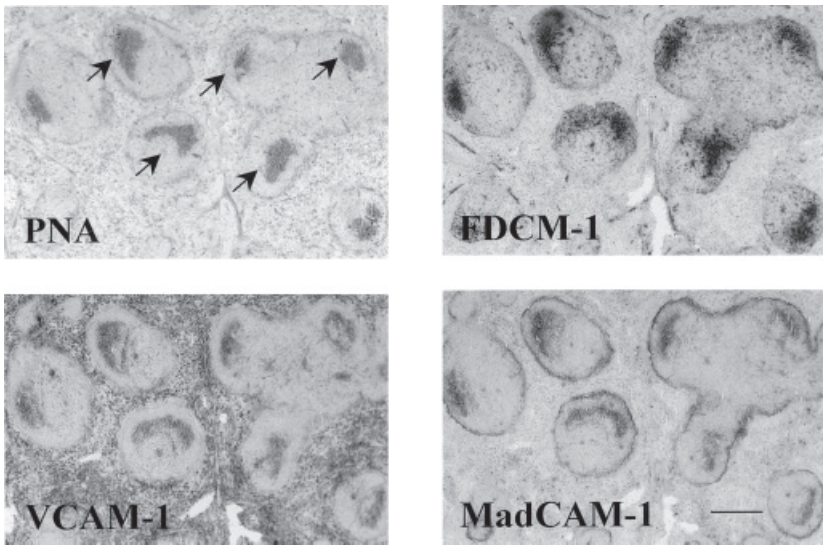


Fig. 6. Expression of VCAM-1 and MadCAM-1 molecules on regressing germinal centers. Adjacent sections from spleens at day 28 of SRBC immunization were labeled using PNA and mAbs as indicated. Arrows point to identical germinal centers. Bar size corresponds to 500 μm.

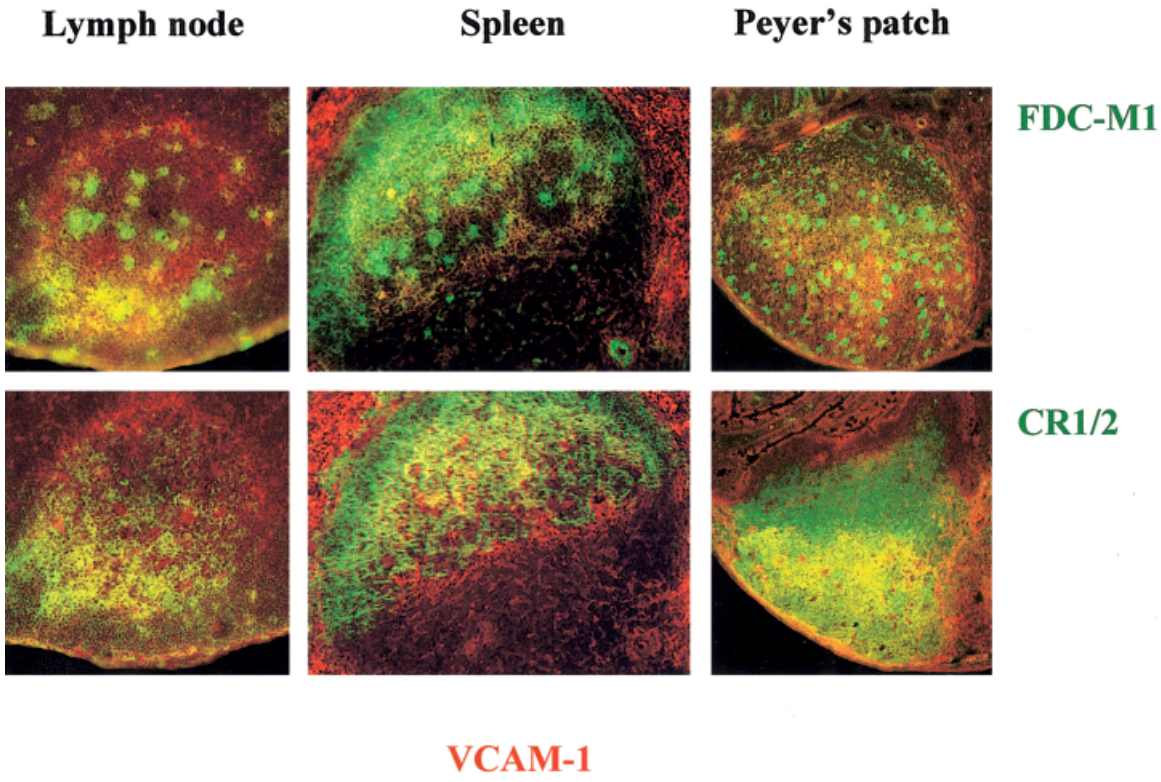


Fig. 7. Coexpression of FDC-associated antigens with VCAM-1 in peripheral lymphoid tissues. Adjacent sections from the indicated tissues were labeled with a combination of lineage-restricted antibodies (green) and biotinylated anti-VCAM-1 antibodies. The spleen and lymph node sections were prepared from previously immunized mice. The overlapping areas are yellow, which appears to be more extensive with anti-CR1.2, still leaving a large CR1.2-positive/VCAM-1-negative segment of the entire antigen-retaining reticulum. The CR1.2 intensity is digitally reduced to accentuate its higher expression on FDCs.

dc_1678_19

displayed the MAdCAM-1 antigen (see above). No reactivity could be observed when rat IgG isotype control antibodies (either unlabeled or biotinylated) were used (results not shown).

DISCUSSION

The maintenance of proper lymphoid tissue architecture under stimulatory conditions requires a coordinated adaptation by both the lymphoid and the stromal components. As a major constituent of follicular stroma, the FDCs have been demonstrated to be instrumental in providing the necessary antigenic stimulus for the engagement of BCR on centroblasts (Tew et al., 1997). This signal is paired with a series of adhesive events aimed at strengthening the association of the two cell types. According to our histological data, on the FDCs there are two different types of cell adhesion molecules: the ICAM-1 molecule (binding to LFA-1) is constitutively expressed (Maeda et al. 1995), whereas the expression of VCAM-1 antigen (which recognizes VLA-4) requires the stimulation of lymphocytes. As another consequence of FDC activation, the MAdCAM-1 antigen is also displayed during the process. Previous studies have established that the ICAM-1 and its ligand, as well as the hyaluronate receptor CD44, are important adhesion molecules in maintaining in vitro cluster formation between activated lymphocytes and FDCs, and in supporting lymphocyte proliferation (Kosco et al., 1992).

A possible mechanism underlying the process may implicate the tumor necrosis factor-lymphotoxin (TNF/LT) family pathway, as these molecules have been demonstrated in the development and compartmentalization of follicular structure, including the maintenance of follicular dendritic cells (Fu and Chaplin, 1999). During lymphocyte activation via a series of T-B interactions (Bishop and Hostager, 2001; McHeyzer-Williams et al., 2001), LTβ is displayed at an increased level (Browning et al., 1995), thus facilitating the ligand binding by LTβR expressed on FDCs (Rennert et al., 1996; Endres et al., 1999). The engagement of LTβR elicits an NFκB-dependent signaling pathway (Mackay et al., 1996; Poljak et al., 1999). As a possible target, both the VCAM-1 and MAdCAM-1 promoter regions have been described to contain NFκB-binding elements (Iademarco et al., 1993; Sampaio et al., 1995), which may explain their simultaneous upregulation during germinal center formation. In a recent in vitro study in humans (Husson et al., 2000), the exposure of tonsillar FDC cultures to TNF and LTα1/β2 increased their expression of VCAM-1 and ICAM-1 molecules. Interestingly, these two ligands elicited different responses, as the TNF had a stronger inducing effect than the LTα1/β2 heterotrimer on the VCAM-1 expression (Husson et al, 2000). Because of its extravascular appearance on FDCs, the MAdCAM-1 antigen is unlikely to be involved in any homing-related functions similar to those displayed on mucosal and Peyer's patches endothelium (Berlin et al., 1993; Kraal et al., 1995). The engagement of the VLA-4 counterreceptor on centroblasts by VCAM-1 may prevent certain forms of apoptosis in centroblasts, or may mediate a costimulatory signal for memory B cell activation (Koopman et al., 1994, 1997). In these processes, the microenvironmental differences of the VCAM-1 and MAdCAM-1 expression and iccosome retention by complement and Fcγ-receptors on FDCs may be instrumental in the centroblasts' survival and selection.

LITERATURE CITED

Balázs M, Horváth G, Grama L, Balogh P. 2001. Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. Cell Immunol 212:126–137.

Balogh P, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK. 2001. Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. Cell Immunol 214:45–53.

Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. Cell 74:185–195.

Bishop GA, Hostager BS. 2001. Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation. Immunol Res 24:97–109.

Browning JL, Dougas I, Ngam-ek A, Bourdon PR, Ehrenfels BN, Miatkowski K, Zafari M, Yampaglia AM, Lawton P, Meier W, Benjamin CP, Hession C. 1995. Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of specific monoclonal antibodies and soluble receptors. J Immunol 154:33–46.

Castro A, Bono MR, Simon V, Vargas L, Rosemblatt M. 1997. Spleen-derived stromal cells. Adhesion molecules expression and lymphocyte adhesion to reticular cells. Eur J Cell Biol 74:321–328.

Endres R, Alimzhanov MB, Plitz T, Futterer A, Kosco-Vilbois MH, Nedospasov SA, Rajewsky K, Pfeffer K. 1999. Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. J Exp Med 189:159–168.

Freedman AS, Munro JM, Rice GE, Bevilacqua MP, Morimoto C, McIntyre BW, Rhynhart K, Pober JS, Nadler LM. 1990. Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-110. Science 249:1030–1033.

Fu YX, Chaplin DD. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. Annu Rev Immunol 17:399–433.

Gao JX, Madrenas J, Zeng W, Zhong R, Grant D. 1997. Generation of dendritic cell-like antigen-presenting cells in long-term mixed leucocyte culture: phenotypic and functional studies. Immunology 91: 135–144.

Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI. 1995. Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. Genes Dev 9:1–14.

Huang MJ, Osborn L, Svahn J, Schiffer SB, Eliseo L, Zhou LJ, Rhynhart K, Benjamin CD, Freedman AS. 1995. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 by follicular dendritic cells. Leuk Lymphoma 18:259–264.

Husson H, Lugli SM, Ghia P, Cardoso A, Roth A, Brohmi K, Carideo EG, Choi YS, Browning J, Freedman AS. 2000. Functional effects of TNF and lymphotoxin α1β2 on FDC-like cells. Cell Immunol 203: 134–143.

Iademarco MF, McQuillan JJ, Dean DC. 1993. Vascular cell adhesion molecule 1: contrasting transcriptional control mechanisms in muscle and endothelium. Proc Natl Acad Sci USA 90:3943–3947.

Jacobsen K, Kravitz J, Kincade PW, Osmond DG. 1996. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. Blood 1996 87:73–82.

Koopman G, Parmentier HK, Schuurman HJ, Newman W, Meijer CJ, Pals ST. 1991. Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathways. J Exp Med 173:1297–1304.

Koopman G, Keehnen RM, Lindhout E, Newman W, Shimizu Y, van Seventer GA, de Groot C, Pals ST. 1994. Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. J Immunol 152:3760–3767.

Koopman G, Keehnen RM, Lindhout E, Zhou DF, de Groot C, Pals ST. 1997. Germinal center B cells rescued from apoptosis by CD40 ligation or attachment to follicular dendritic cells, but not by engagement of surface immunoglobulin or adhesion receptors, become resistant to CD95-induced apoptosis. Eur J Immunol 27:1–7.

dc_1678_19

Kosco MH, Pflugfelder E, Gray D. 1992. Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro. J Immunol 148:2331–2339.

Kraal G, Schornagel K, Streeter PR, Holzmann B, Butcher EC. 1995. Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen. Am J Pathol 147:763–771.

Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck C, Buck CA, Labow MA. 1995. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. Development 121:489–503.

Mackay F, Majeau GR, Hochman PS, Browning JL. 1996. Lymphotoxin beta receptor triggering induces activation of the nuclear factor kappaB transcription factor in some cell types. J Biol Chem 271:24934–24938.

Maeda K, Kosco-Vilbois MH, Burton GF, Szakal AK, Tew JG. 1995. Expression of the intercellular adhesion molecule-1 on high endothelial venules and on non-lymphoid antigen handling cells: interdigitating cells, antigen transporting cells and follicular dendritic cells. Cell Tissue Res 279:47–54.

McHeyzer-Williams LJ, Driver DJ, McHeyzer-Williams MG. 2001. Germinal center reaction. Curr Opin Hematol 8:52–59.

Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. 1995. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. Proc Natl Acad Sci USA 92:9647–9651.

Poljak L, Carlson L, Cunningham K, Kosco-Vilbois MH, Siebenlist U. 1999. Distinct activities of p52/NF-kappa B required for proper secondary lymphoid organ microarchitecture: functions enhanced by Bcl-3. J Immunol 163:6581–6588.

Qin D, Wu J, Vora KA, Ravetch JV, Szakal AK, Manser T, Tew JG. 2000. Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. J Immunol 164:6268–6275.

Rennert PD, Browning JL, Mebius R, Mackay F, Hochman PS. 1996. Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. J Exp Med 184: 1999–2006.

Ruco LP, Pomponi D, Pigott R, Gearing AJ, Baiocchini A, Baroni CD. 1992. Expression and cell distribution of the intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, endothelial leukocyte adhesion molecule, and endothelial cell adhesion molecule (CD31) in reactive human lymph nodes and in Hodgkin's disease. Am J Pathol 140:1337–1344.

Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. 1995. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. J Exp Med 181:411–415.

Sampaio SO, Li X, Takeuchi M, Mei C, Francke U, Butcher EC, Briskin MJ. 1995. Organization, regulatory sequences, and alternatively spliced transcripts of the mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) gene. J Immunol 155:2477–2486.

Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torok-Storb B, Gallatin WM. 1992. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. Blood 80:388–395.

Szakal AK, Taylor JK, Smith JP, Kosco MH, Burton GF, Tew JJ. 1990. Kinetics of germinal center development in lymph nodes of young and aging immune mice. Anat Rec 227:475–485.

Tew JG, Wu J, Qin D, Helm S, Burton GF, Szakal AK. 1997. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. Immunol Rev 156:39–52.

Tew JG, Wu J, Fakher M, Szakal AK, Qin D. 2001. Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. Trends Immunol 22:361–367.

dc_1678_19

dc_1678_19

Age-related depression of FDC accessory functions and CD21 ligand-mediated repair of co-stimulation

Yüksel Aydar[1], Péter Balogh[1], John G. Tew[2] and Andras K. Szakal[1]

[1] Department of Anatomy and Neurobiology, and The Immunology Group, Virginia Commonwealth University, Medical College of Virginia, Richmond, USA
[2] Department of Microbiology and Immunology, Virginia Commonwealth University, Medical College of Virginia, Richmond, USA

Morphological and kinetic studies of immune complex (IC) trapping by follicular dendritic cells (FDC) show marked age-related deficits. We postulated that a reduction in trapped IC, which generate CD21 ligands (L) on FDC, would lead to inadequate FDC-Ag-B cell interactions resulting in depressed Ab responses. To determine whether the age-related defect was the result of the aging of FDC or changes in the *in vivo* microenvironment of FDC (*i.e.* aging B and T cells), FDC-B cell-T cell-Ag interactions were studied in *in vitro* germinal centers where various combinations of old and young cells could be compared. Since we reasoned that reduced IC on FDC would generate less CD21L needed to stimulate the B cell co-receptor via CD21, we also examined the role of complement (C'). The hypothesis that aging reduces the accessory activity of FDC was tested with increasing numbers of FDC from young (12 weeks) or old (20 months) mice in the presence of young (12 weeks) B and T lymphocytes. The Ag-specific stimulatory activity of FDC was studied using the OVA-specific Ab response which was reduced by 40–50% in the presence of old FDC. Antigen-independent FDC-mediated co-stimulation was studied by using LPS to stimulate B-lymphocytes to produce immunoglobulin (Ig). In the presence of old FDC, co-stimulation was decreased by 70–80% in the LPS system. Incubation of aged FDC with IC and C' to provide FDC with CD21L restored co-stimulatory activity to near normal levels. In marked contrast, no defects in old B and T cells were apparent. The data suggest that the Ag handling capacity and co-stimulatory activity of old FDC become defective with aging and this appears to be a consequence of reduced trapping and presentation FDC-Ag and CD21L to B cells.

Received	30/1/02
Revised	24/5/02
Accepted	6/8/02

Key words: Follicular dendritic cell / CD21 ligand / Immune complex trapping / Antigen presentation/processing

1 Introduction

The aging immune system is characterized by a progressive decline in responsiveness to exogenous Ag that may contribute to an increased morbidity and mortality in the elderly [1–3]. Age-related alterations of the immune system affect both Ab and cell-mediated immunity. Senescence leads to the appearance of atrophic follicular dendritic cells (FDC) [4] that trap and retain little immune complex (IC), generate few iccosomes and memory B cells, and induce a reduced number of germinal centers (GC) [5]. The lack of IC on old FDC is attributable, at least in part, to the fact that IC tend to remain in the lymph node sinuses because IC are not carried to the FDC-reticulum by antigen-transporting cells [4, 5]. This prompted the hypothesis that deficient Ab responses to T cell-dependent exogenous Ag, such as influenza vaccines, in the aged may reflect intrinsic FDC defects or altered FDC-B cell interactions.

FDC are thought to play a pivotal role in the formation of GC, selection and differentiation of memory B cells, and maintenance of secondary Ab responses [6]. FDC trap and retain Ag in the form of IC via their Fc [7, 8] CR1, and CR2 receptors [9–11]. Further, FDC develop ICCOSOMES [immune complex-coated bodies (some-s)] [12] that deliver the Ag to B cells for endocytosis, Ag pro-

[I 22811]

Abbreviations: FDC: Follicular dendritic cell **IC:** Immune complex **GC:** Germinal center **CD21L:** CD21 ligand **ICCOSOMES:** Immune complex-coated body **BCR:** B cell receptor **TBM:** Tingible body macrophage

© 2002 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 0014-2980/02/1010-2817$17.50+.50/0

cessing, and presentation to T helper cells [12, 13].

FDC provide B cells with Ag-specific primary signals via the engagement of FDC-Ag and the B cell Ag receptor (BCR) [14]. FDC also provide an Ag-independent secondary signal to B cells via engagement of B cell CD21, in the B cell co-receptor complex, by the complement-derived CD21 ligand (L) on FDC [15–17]. Both the primary and secondary signals presented by FDC are crucial for initiation and development of the GC reaction that leads to efficient clonal expansion of Ag-specific B cells, diversification of their immunoglobulin genes, selection of clones bearing BCR of high affinity, and finally to differentiation into memory B cells and plasma cells [18–21].

Antigen injected into immune animals immediately complexes with specific Ab and uses one of two pathways to enter lymphoid organs. In the "classical pathway," most IC are endocytosed by macrophages [22], rapidly degraded, and cleared from the draining lymph nodes in 2-3 days [23]. The "alternative pathway" is an adaptation that uses picogram quantities of Ag efficiently in an environment rich in specific Ab and leads to the formation of the Ag-retaining FDC-reticulum [5, 24], a microenvironment, where the Ag, FDC, specific B cells, and T helper cells needed for GC development are brought together.

Although the phenomenon of age-associated decline in the specific Ab response in humans as well as in mice is well known, the cellular basis of this defect has not been defined. Age-related changes in FDC-networks, IC trapping, and GC numbers and size prompted the hypothesis that in old mice, depressed secondary Ab production is due to the reduced amount of FDC-trapped Ag and a consequent reduction in the quantity of CD21L needed for co-stimulation of B cells. To test this hypothesis, memory lymphocytes or naïve lymphocytes were cultured with OVA-anti-OVA IC or LPS in the presence of young or old FDC. In addition, FDC were incubated with IC and complement in an attempt to generate CD21L on FDC in vitro prior to culture. The results suggest that aging impairs the accessory functions of FDC. Both Ag presentation (stimulation) and co-stimulations of B cells decline, a defect that can be reversed upon the incubation of FDC with IC and C'. In contrast, the functions of aged B cells and T cells were less affected. A reasonable interpretation would be that deficits in the immune responses of the aged are largely attributable to the reduced ability of FDC to provide B cells with Ag and CD21L.

2 Results

2.1 Number of young and old FDC

Two monoclonal Ab, FDC-M1 and anti-CR1.2, which label FDC intensely [25], were used to determine by flow cytometric analysis if the number of FDC in old and young mice differs in the enriched fraction. The FDC-enriched cells were: 1.) incubated with anti-FDC-M1 mAb and visualized with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-rat Ab (Fig. 1A and C); 2.)– incubated with anti-CR1.2 and visualized with FITC-conjugated mouse anti-rat Ab (Fig. 1B and D). A cocktail of PE-conjugated Thy1.2 and anti-CD19 was used to distinguish lymphocytes and the Thy1.2-reactive tingible body macrophages (TBM), which are reactive with both Th1.2 and FDC-M1 [26]. The B and T lymphocytes then localized in the upper left quadrant of the graph. The FDC-M1 and Th1.2-reactive TBM, double-labeled with FDC-M1 and Th1.2 localized in the upper right quadrant of the graph. FDC labeled with either FDC-M1 or anti-CR1.2 localized in the right lower quadrant. Note, that the results using FDC-M1 and CR1.2 were similar and the percentage of FDC in the young and old FDC preparations was about 25% (Fig. 1).

2.2 *In situ* labeling of FDC network

The FDC-networks in young and old mice were labeled using FDC-reactive monoclonal Ab, FDC-M1 and FDC-M2. FDC-M1 labeling showed surprisingly well-developed FDC-networks in both young (Fig. 2) and old

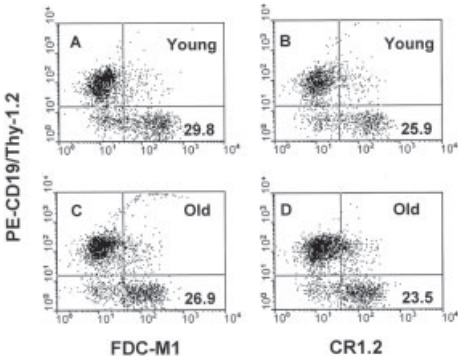


Fig. 1. Flow cytometric analysis of young and old FDC populations. A cocktail of PE-conjugated Thy1.2 and anti-CD19 was used to exclude T and B cells. The percentage of single-positive cells for FDC-M1$^+$is illustrated in the *lower right quadrant* of (A) in young and (C) in old FDC. The percentage of CR1.2$^+$-positive cells is illustrated in the *lower right quadrant* of (B) in young and (D) in old FDC. These results are representative of five experiments.

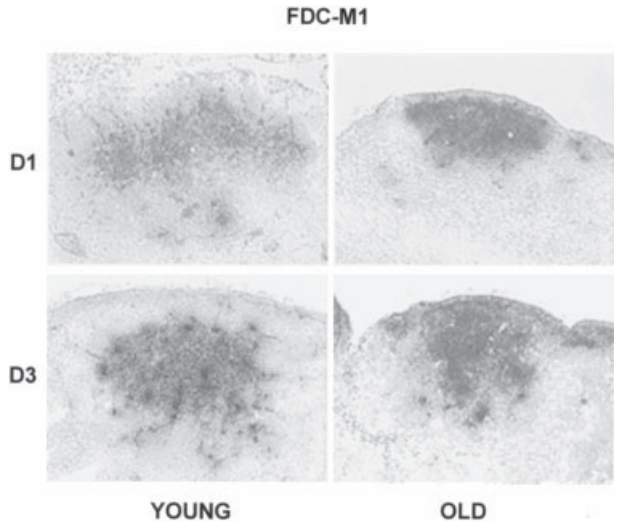


Fig. 2. Immunohistochemical labeling of FDC-reticulum with the mAb FDC-M1. FDC-M1 was used in conjunction with biotin amplification and aminoethyl carbazole development. Observe, that there are minimal size differences between young and old FDC-networks.

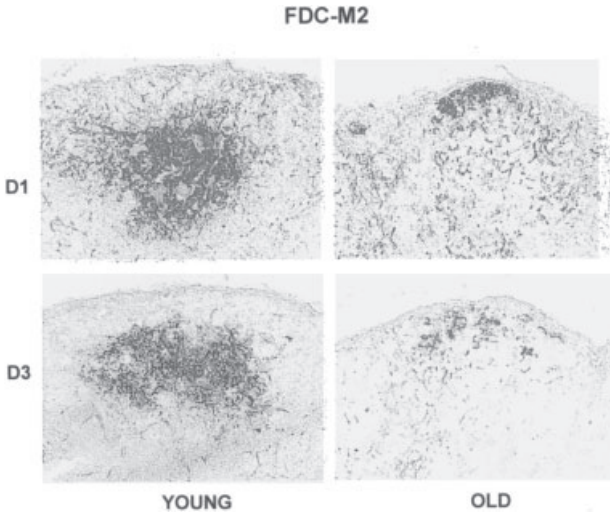


Fig. 3. Immunohistochemical labeling of FDC-reticulum with the mAb FDC-M2. FDC-M2 was used in conjunction with biotin amplification and aminoethyl carbazole development. Observe, that the old FDC-network is considerably smaller. FDC-M2 labeling reflects immune complex trapping since it labels C4.

(Fig. 2) mice. However, studies with FDC-M2, which reacts with the C'4 fragment of complement deposited on FDC [27] showed well-developed labeling of young (Fig. 3), but significantly reduced labeling of old FDC-networks (Fig. 3). The reduction in binding of FDC-M2 is consistent with the known reduction in the level of IC retained by old FDC [4, 5].

2.3 Expression of FcR and CR1, 2 on old FDC

The reduced level of IC on FDC prompted us to check for FcR and CR1,2 one day after Ag challenge when these receptors interact with IC. The data indicated that old FDC express substantial levels of FcR but the level appears to be reduced when compared with young FDC (Fig. 4). Nevertheless, the levels of FcR were much higher than those on surrounding B cells, and we reasoned that these Fc receptors should be able to bind IC if they were available. The expression of CR1,2 on old FDC was also substantial (not shown) and confirmed the flow cytometric data in Fig. 1. Furthermore, incubation of old FDC with IC and C' increased the FDC-M2-labeling population from 6 to 28% (Fig. 5), which corresponds with the number of FDC-M1-positive cells in the FDC preparation (Fig. 1). We attribute this labeling to the activation of complement by IC binding to Fc and C' receptors on FDC, and further the binding of the C4 cleavage product to the IC on the FDC. Controls included peritoneal macrophages and lymphocytes which likely internalized IC and did not show FDC-M2 expression after incubation with IC and C' (Fig. 5).

2.4 OVA-specific Ab production by young memory lymphocytes (B+T) in the presence of young and old FDC

To compare the accessory activity of young and old FDC, we studied the effect of age on FDC-lymphocyte interaction in vitro. For these co-cultures, memory lym-

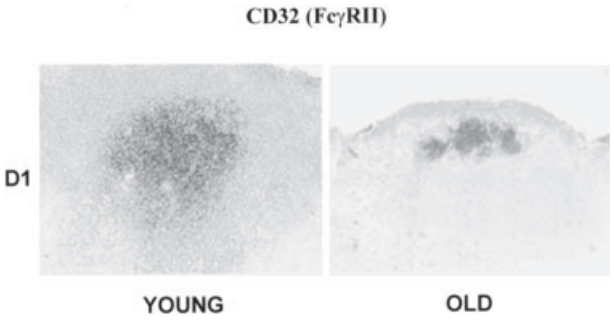


Fig. 4. Immunohistochemical labeling of FDC-networks with anti-FcγRII in young and old mice 1 day after challenge with the OVA. Anti-FcγRII was used in conjunction with biotin amplification and aminoethyl carbazole development. Note, that old FDC do express substantial levels of FcR, but the level appears to be reduced.

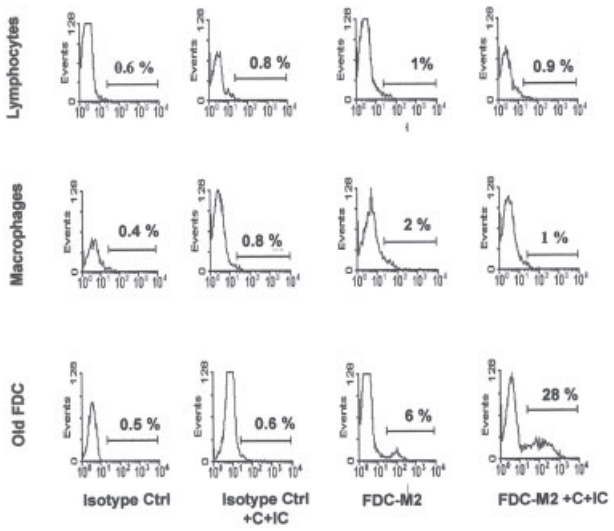


Fig. 5. Increased FDC-M2 labeling on old FDC after incubation with IC and C'. Old FDC were incubated with freshly isolated mouse serum and OVA-IC overnight at 37°C. Then old FDC-enriched cell samples were incubated with FDC-M2 mAb and visualized using a FITC-conjugated secondary Ab. Controls included peritoneal macrophages and lymphocytes that did not show FDC-M2 expression. Note, that incubation of old FDC with C' and IC increased FDC-M2 labeling from 6-28%.

phocytes (B+T) were used from actively OVA-immunized young BALB/c mice. FDC from non-immunized young BALB/c mice or from old BALB/c mice were added to the lymphocytes in increasing numbers. The cells were co-cultured in triplicate wells, in the presence of preformed OVA IC. Controls consisted of lymphocytes alone, lymphocytes plus OVA IC, FDC alone and FDC plus IC. The OVA-induced Ig measurement at peak response (day 14) showed (Fig. 6) that in the presence of young FDC over a dose range, B cells produced about 40–50% more anti-OVA Ab than B cells in the presence old FDC.

2.5 Comparison of co-stimulatory activity of young and old FDC

To discriminate between presentation of Ag to BCR and co-stimulation, we designed a study that helps to dissect the co-stimulatory activity of FDC. Since co-stimulation is an Ag-independent event, a non-Ag-dependent system was used and lymphocytes (B+T) were stimulated with LPS. In this study lymphocytes were isolated from non-immunized young or old BALB/c mice, and FDC from non-immunized young and old BALB/c mice. The lymphocytes were cultured in the presence of LPS (10 μg/ml/well) plus increasing numbers of FDC. Controls were lymphocytes alone, lymphocytes plus LPS,

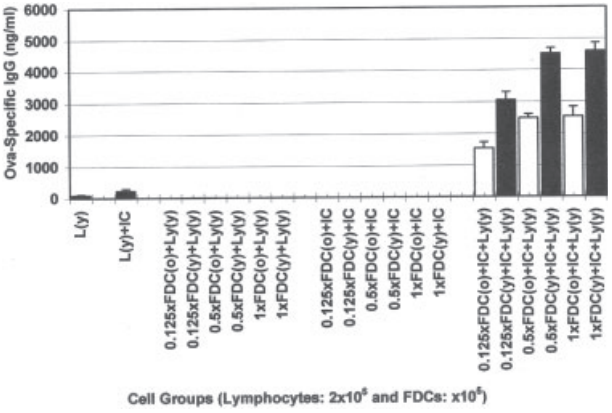


Fig. 6. Comparison of the ability of young and old FDC to stimulate Ab production. Anti-OVA IgG in culture supernatants was measured on day 14. At each of the three FDC doses, the young FDC were higher than the old FDC ($p<0.02$). These data are typical of three experiments of this type.

FDC alone and FDC plus LPS. IgG production was obtained using LPS alone, but the addition of FDC dramatically increased these IgG responses. This FDC effect is most obvious with sub-optimal levels of polyclonal activator where 10-1,000-fold increases in IgG production are obtained [15]. The LPS-induced total IgG response showed (Fig. 7) that old FDC could provide only about 20–30% of the normal co-stimulatory activity.

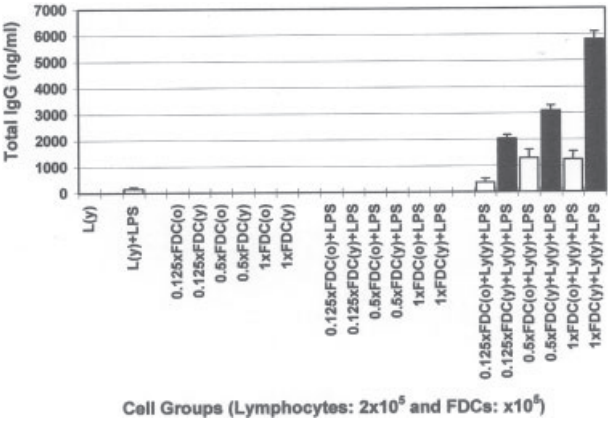


Fig. 7. Comparison of co-stimulatory activity in young and old FDC. LPS induced IgG responses in young B cells and FDC provided co-stimulatory signals. LPS-induced IgG in supernatants from days 7-14 was measured using ELISA. At each of three FDC doses, the young FDC were higher than old FDC ($p<0.01$). These results are typical of five experiments.

dc_1678_19

2.6 Repair of FDC co-stimulation

Since we know from the *in vivo* studies that old FDC trap and retain very few IC, we reasoned that CD21L would be reduced on old FDC as the consequence of reduced IC trapping and retention. To study the possibility that reduced CD21L reduces co-stimulation, we set up co-cultures with young and old FDC and LPS. In this study, however, some FDC were pre-incubated with active or inactivated complement and IC. The results showed (Fig. 8) that co-cultures of aged FDC incubated with complement and IC to increase FDC-CD21L produced nearly as much antibody as co-cultures with young FDC.

2.7 Co-cultures of old T cells with young B cells and young FDC

The capacity of old T cells to provide help was studied by co-culturing them with young B cells and young FDC in the presence of OVA-anti-OVA IC. T cells were isolated from OVA-primed young and old mice 2 weeks after priming. B cells were isolated from young OVA-immune mice. Both T and B cells were purified using Macs depletion columns, and they were over 92% pure. Young and old T cells were titrated to a constant number of young B cells. The starting concentration for young and old T cells was adjusted to the *in vivo* ratio of B and T cells in young and old mice. The *in vivo* ratio of B and T cells in lymph nodes of young mice was about 1:6 and in old mice it was about 1:3. The B cell and FDC populations

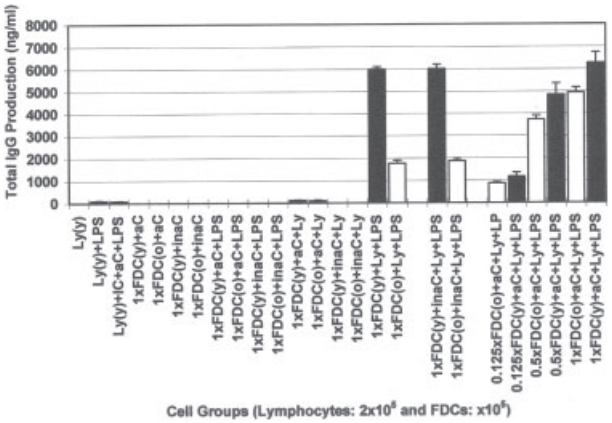


Fig. 8. Restoration of FDC co-stimulatory activity on old FDC by addition of IC and complement to generate more FDC-CD21L. Addition of IC plus active C' converted the aged FDC into potent accessory cells comparable with young FDC. These data are typical of three experiments of this type and results are depicted as the mean ±SEM of total IgG produced.

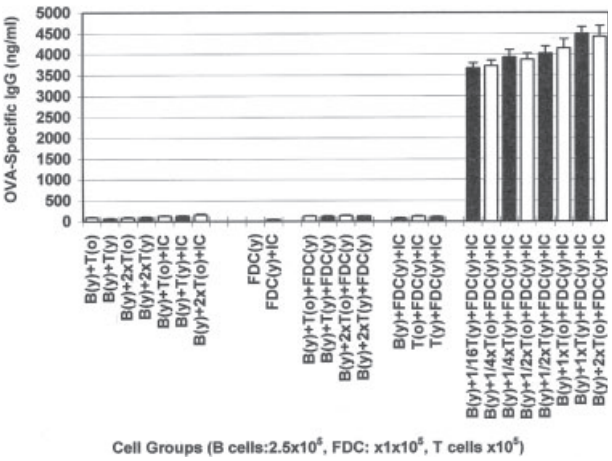


Fig. 9. Comparison of the ability of young and old T cells to provide B cell help. Various numbers of T cells were co-cultured with constant number of young memory B cells (2.5×10^5) and FDC (1×10^5). T cells were adjusted to *in vivo* ratios. The capacity of old T cells to provide help showed no apparent deficit. The OVA-specific IgG was measured in day 7–14 cultures by ELISA. The results are typical of three experiments of this type and results are depicted as the mean ±SEM of total IgG produced.

were held constant (2.5×10^5 and 1×10^5/well, respectively), and old and young T cells were titrated over a dose range (1.9×10^5/well to 15×10^5/well). The specific IgG measurement showed (Fig. 9) that old T cells worked as well as young T cells and that T cell help was not a limiting factor over a broad range of T-B ratios.

2.8 Co-cultures of old B cells with young FDC

To determine if old B cells are defective in their ability to produce Ab, young and old lymphocytes (B+T) stimulated with LPS were co-cultured in the presence of increasing numbers of young FDC. The LPS-induced Ig measurement at peak Ab production (day 14) showed (Fig. 10) that in the presence of young FDC, old B cells produced IgG as well as young B cells.

3 Discussion

Optimal humoral immune responses to T cell-dependent Ag require T cells, B cells and FDC [12, 13, 28, 29]. FDC in old mice trap and retain reduced quantities of IC [4, 5] and are virtually unable to stimulate germinal center formation [4, 5]. The lack of IC on FDC is thought to relate to the fact that only a small amount of IC is transported by the antigen-transporting cells to the FDC-reticulum in the outer cortex of the lymph node. In addition, macro-

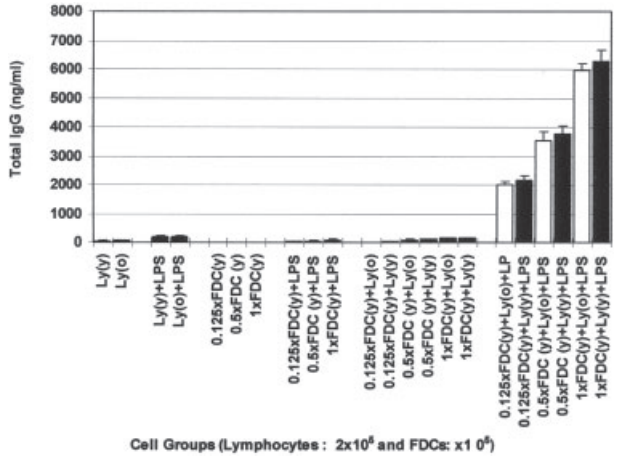


Fig. 10. Comparison of the ability of old and young B cells to produce Ab. Old LPS-activated B lymphocytes produced Ab as efficiently as young B lymphocytes upon co-culture with young FDC over a dose range. LPS-induced total IgG from day 7–14 cultures was measured by ELISA. These results are typical of three experiments of this type and are depicted as the mean × SEM of total IgG produced.

phages clear some IC from the surfaces of FDC and convolutions of old FDC dendrites do not appear to protect the retained antigen from macrophages as well as young FDC [4, 5, 12]. The consequence is that the amount of antigen retained on FDC in aged animals is dramatically reduced, and that is consistent with the observation that FDC-M2 (anti-C4) does not label old FDC well. Thus, even though aged FDC have CD21 (near normal levels), the level of retained IC is low. Moreover, aged FDC produce few or no iccosomes for delivery of Ag to B cells for endocytosis, Ag processing and presentation to T cells [4, 5]. In addition, the number of FDC-reticula is reduced, and GC size and numbers are decreased [4, 5]. In this report, we attempted to determine if the major age-associated depression of specific Ab production result from age-related defects in B cells, or T cells, and/or FDC and if the ability of FDC to provide Ag and co-stimulation via CD21L is normal. The results indicate a marked reduction in the accessory activity of aged FDC. In contrast, no defects in old B cells and T cells were apparent in our co-cultures.

Since *in vivo* Ag localization studies suggested a reduction in the number of FDC [4, 5], it was uncertain whether the FDC isolated from young and old mice represented comparable size populations. To ascertain this, we determined the percentage of isolated FDC in the total cell isolate using mAb FDC-M1 in conjunction with flow cytometric analysis and found that the number of FDC remained much the same in both young and old mice. Subsequent immunohistochemistry using the FDC-M1 Ab essentially confirmed the flow cytometric findings. In contrast, immunohistochemistry obtained on FDC-networks with the monoclonal Ab, FDC-M2, which labels C4 on FDC and it is bound there during Ag trapping [27], gave the same results as Ag localization studies [4, 5, 22, 30] and labeled a significantly reduced number of FDC. From these results we concluded that it is not the number of FDC that is affected by age, but their capacity to trap and retain Ag. Nevertheless, old FDC do express substantial levels FcR and C' receptors and no deficits in complement have been reported in aged individuals suggesting that the lack of immune retention is not likely attributable to a lack of complement [31–33]. Thus, as supported by data in Fig. 5, it appears that the Fc and/or C' receptors of old FDC are capable of capturing and retaining IC on their surfaces when given an opportunity to interact with IC.

The GC is involved in a number of functions. In recall responses, the immunogen is rapidly converted into IC by Ab induced by the primary immunization, and these IC are transported to FDC and germinal centers rapidly develop [5, 24]. In the early stage the GC reaction B cells are converted into plasmablasts which home to medullary cords and the bone marrow where they become plasma cells and produce the vast majority of Ab in recall responses [34]. By day 7 this early phase of the GC reaction is largely past and the B memory cell compartment is restored by the later phase of the GC reaction. In order to isolate FDC functions from their *in vivo* environment, we studied specific Ab production in co-cultures. Old FDC co-cultured with young B cells exhibited a substantial reduction (40–50%) in OVA-induced Ab production compared to that of young FDC. We reasoned that the reduced Ab levels in old FDC co-cultures resulted from an age-related deficit in FDC accessory activity. In previous studies with the polyclonal activators LPS (for mouse B cells) and pokeweed mitogen (for human B cells) it was shown that CD21L on FDC provide a potent co-signal necessary for optimal IgG antibody production [7, 35]. In order to differentiate between Ag presentation and co-stimulation, we extended our studies to an Ag-independent system where we used LPS instead of OVA. We found a considerable reduction in LPS-induced Ab production in the presence of old FDC in comparison to young FDC. The results suggested that aging interferes with the co-stimulatory capacity of FDC. Recent studies have demonstrated that FDC provide a complement-derived CD21L for binding to B cell CD21 [15]. CD21L interaction with the CD21 in the CD19-CD21-CD81 complex delivers a positive co-signal for B cell activation and differentiation [15]. The accessory activity of FDC for LPS stimulated B cells is dependent on CD21-CD21L interactions [15]. Furthermore, FDC are highly positive for FcγRIIB [7]. FDC bearing FcγRIIB bind Fc on IC and mini-

mize the co-ligation of B cell FcγRIIB and BCR by IC, thus, intervening with the delivery of a negative B cell signal via activation of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) [7]. Therefore, we suggest that age-associated defects in FDC-mediated co-stimulation may originate from a defect in multiple receptor-ligand interactions including CD21L, CD21, and FcγRII.

Therefore, based on the molecular model of FDC-B cell interaction, we reasoned that the cause of the reduction in co-stimulation in old individuals might be the low availability of FDC-IC-associated CD21L for binding to the B cell co-receptor, CD21, to deliver the co-stimulatory signal. To try to remedy such a putative situation, we co-cultured FDC treated with complement and IC and LPS stimulated lymphocytes. We reasoned that IC would bind to FDC, activate the complement cascade and generate more CD21L. The FDC-CD21L can then bind to B cell-CD21 for co-stimulation. Our treatment of FDC with complement and IC repaired the age-related defect in co-stimulation in aged FDC while not altering young FDC activity, suggesting that they have sufficient CD21L. Both B cells and T cells have been shown to be affected by aging [36–38]. Therefore, it might be assumed that the reduced immune response *in vivo* may result from the common age-associated defects of FDC, B cells, and T cells. However, previous studies showed that J11D^{lo} cells – the precursors of GC B memory cells – were not altered by aging and responded to T cell-dependent Ag stimulation as vigorously as young B memory cells [39]. Thus, it might be expected that aging B cells will not interfere with Ab production. We also anticipated that T cell defects were negligible as very few T helper cells are thought be involved in the interaction with B cells in the follicular microenvironment. Furthermore, preliminary flow cytometric analyses showed that CD4$^+$ T cells were present essentially in equal numbers in young (59%) and old (55%) lymph nodes (unpublished data).

To test our reasoning, we conducted experiments where we co-cultured LPS-stimulated young and old lymphocytes in the presence of young FDC. Since it was not possible to use old memory B cells, as these would be scarce in old animals due to an 80–90% reduction in the secondary Ab response, we used the same system as for the study of co-stimulation. The results showed that the level of Ab produced upon LPS-stimulation of young or old B cells was the same in the presence of young FDC. This finding suggests that the age of B cells does not contribute to the depressed Ab production. We also assessed the effect of aging of T cells for their contribution to Ab production *in vitro* using Ag-primed old T and young memory B cells and young FDC. The results from this study showed no apparent difference in Ab production between co-cultures using young or old T cells. These observations are consistent with earlier observations that unresponsiveness of the aged spleen cells to pneumococcal vaccines was not due to an intrinsic B cell defect or to T cell-mediated immunosuppression, but resulted from an accessory cell deficiency [40]. Moreover, our findings confirm and extend *in vivo* cell transfer studies showing that even after transfer of immune B and T cells, the anamnestic Ab response of old mice was still compromised [41].

In summary, our results suggest that both the Ag handling capacity and co-stimulatory activity of FDC from old mice are defective. Remedy of CD21L on aging FDC appears to repair the defective co-stimulatory activity of aging FDC. Thus, FDC appear to form the “major bottle neck” in aged animals in the anamnestic Ab response and germinal center reaction rather than B or T cells.

4 Materials and methods

4.1 Animals

BALB/c mice at 2–3 months and 20–21 months of age were purchased from the NIA contract facility, Harlan, Indianapolis, Indiana. The mice were housed in standard plastic shoebox cages with filter tops. Food and water were supplied *ad libitum.* The young and old mice were handled in accordance with VCU Animal Care and Use guidelines.

4.2 Immunizations

As described previously [42, 43], mice received an initial 0.1 ml injection behind the nape of the neck consisting of 200 μg/ml of aluminum potassium sulfate. Two weeks later, the mice were given a booster immunization of 50 μg of OVA i.p. and by s.c. injection 20 μg of OVA into each of the front legs and hind feet. In addition**,** to obtain lymphocytes for T cell purification, young and old mice were primed by a single dose of OVA, (as above).

4.3 FDC isolation

FDC were isolated from lymph nodes (brachial, axillary, inguinal, popliteal, mesenteric, and paraaortic) of non-immune young and old mice by using previously described enzymatic dissociation (29, 34, 41, 44), except that a 600 rad, ^{137}Cs-source irradiation was used (42). The high irradiation dose does not interfere with FDC accessory functions, but eliminates many of the B and T cells. A 50% Percoll gradient centrifuged for 25 min at 700×g was used to isolate FDC at a density of 1.050-1.060 g/ml.

4.4 Antibodies and other reagents

The rat mAb against CR1.2 (CD21/35, clone 7G6), CD16/32 (clone 2.4G2), Phycoerythrin (PE)-conjugated Thy1.2, PE-conjugated CD19, and the reagent, streptavidin-PE, were obtained from BD PharMingen (San Diego, CA). The sheep anti-rat IgG-FITC conjugate was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). The normal rat serum, propidium iodide, and phenyl-hydrazine-HCl were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Low-tox-m rabbit complement was purchased from Cedarlane Laboratories Limited (Westbury, N.Y.). The FDC-M1 and FDC-M2 hybridoma cell lines were generously provided by Dr. Marie Kosco-Vilbois (Serono, Switzerland), and their supernatant was used as primary Ab.

4.5 Flow cytometric analysis

The fraction of young and old FDC in the cell isolates was determined by flow cytometry. FDC were identified by incubating the cells with FDC-M1 or 7C6 mAb for 45 min and then with FITC-conjugated secondary Ab on ice for 45 min. Subsequently, the cells were incubated with a cocktail of PE-conjugated anti-CD19 and anti-Thy1.2 on ice for 45 min after a 20 min 2.4G2 (FcγRII/III Receptor) blocking to determine contaminating T lymphocytes, B lymphocytes, and FDC-M1-positive TBM [26, 44]. As a negative control for FDC-M1 staining, the cells were incubated with normal rat serum. Dead cells were excluded from analysis using propidium iodide (P 4170, Sigma) uptake. Data from 2×10^4 events were obtained with a Becton Dickinson FACScan equipped with He-Ne laser, and were analyzed with CellQuest software, based on forward and side scatter.

4.6 Immunohistochemistry

Young and old mice were actively immunized with OVA and challenged 1 and 3 days before use. Immunohistochemistry was done using procedures as described previously [45].

4.7 OVA-primed T and memory B cell purification

Lymphocytes were isolated from OVA-primed young and old mice and the primed lymphocytes were isolated from OVA-immunized young mice as described earlier. To purify primed T cells after a biotin-conjugated B220 incubation for 45 min, the cells were incubated with streptavidin-conjugated MicroBeads (Miltenyi Biotech) for another 45 min. Subsequently, the cells were layered on a Max depletion column; LD column (Miltenyi Biotech) and the T cells were obtained from the effluent. To purify B-lymphocytes, the primed lymphocytes were incubated after a 45-min biotin-conjugated Thy1.2 incubation with streptavidin-conjugated beads for another 45 min. Subsequently, the cells were layered on a Max depletion column. The purified B cells were obtained from the effluent.

4.8 Immune complex preparation

OVA and affinity-purified anti-OVA were used to prepare IC for use in cultures. A final ratio of 1 ng/ml OVA to 6 ng/ml anti-OVA was used to make up the IC in Ag excess. The solution was incubated for 2 h at 37°C in a CO_2 incubator prior to use.

4.9 Incubation of FDC with complement and IC

Young and old FDC were incubated with IC (50 ng/ml) and low-tox-mouse complement (at 1:12 final dilution for 1×10^6 cells/ml) for 2 h at 37°C in a CO_2 incubator. The incubation was contacted in small (35×10 mm) petri dishes containing 3 ml of complete medium consisting of DMEM supplemented with 5% BSA (BSA was substituted for the conventionally used FCS to reduce complement toxicity), 20 mM Hepes, 2 mM glutamine, 50 μg/ml gentamicin, and MEM-nonessential amino acids.

4.10 Cell cultures

Enriched FDC preparations were added in increasing numbers (*i.e.* 0.125×10^5, 0.5×10^5, and 1×10^5 cells/well) to 2.5×10^5 B+T memory lymphocytes or to non-stimulated lymphocytes in 96-well culture plates (CoStar; Cambridge, MA). When FDC are depleted from the FDC-enriched preparations using FDC-specific mAb, the remaining cells consistently fail to promote Ab production [7, 35]. In all experiments where FDC are used, the B cells contaminating the FDC preparations are few in numbers (5%) and are irradiated resulting in minimal responsiveness. The wells contained 200 μl/well of complete medium consisting of DMEM supplemented with 10% FCS, 20 mM Hepes, 2 mM glutamine, 50 μg/ml gentamicin, and MEM-nonessential amino acids. Anti-OVA and OVA IC were prepared and used to stimulate the memory lymphocytes. To test the Ag-independent co-stimulatory capacity of FDC, 10 μg/well LPS (L-2387, Sigma) was used as a polyclonal B cell activator. Sub-optimal levels of LPS were used in the present study of co-stimulation because we wanted to determine if old FDC have normal co-stimulatory activity and FDC co-stimulatory activity is most apparent at sub-optimal concentrations of LPS. The cultures were incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. The supernatants were harvested on days 7 and 14. Each experimental group was tested in triplicate. The supernatants were assayed for either OVA-specific or LPS-stimulated total Ab using ELISA.

4.11 ELISA

Ovalbumin-specific IgG or LPS-induced total IgG were measured by means of a solid-phase ELISA as described by Helm et al. [15, 47] and Qin et al. [15]. The Immuno 4 ELISA (Dynex Technologies, Inc.) plates were coated with 50 μl of OVA (0.1 mg/ml)/well or 100 μl of goat anti-mouse IgG (1 μg/

ml)/well (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and incubated overnight at 4°C. The culture supernatants from days 7 and 14 were used to measure Ab levels.

Acknowledgement: This research was supported by National Institutes of Health grant AG-17063.

References

1 **Callard, R. E., Basten, A. and Waters, L. K.,** Immune function in aged mice. II. B cell function. *Cell Immunol.* 1977. **31:** 26–36.

2 **Powers, D. C.,** Effect of age on serum immunoglobulin G subclass antibody responses to inactivated influenza virus vaccine. *J. Med. Virol.* 1994. **43:** 57–61.

3 **Weyand, C. M., Brandes, J. C., Schmidt, D., Fulbright, J. W. and Goronzy, J. J.,** Functional properties of CD4+. *Mech. Ageing Dev.* 1998. **102:** 131–147.

4 **Szakal, A. K., Taylor, J. K., Smith, J. P., Kosco, M. H., Burton, G. F. and Tew, J. G.,** Kinetics of germinal center development in lymph nodes of young and aging immune mice. *Anat. Rec.* 1990. **227:** 475–485.

5 **Szakal, A. K., Kapasi, Z. F., Masuda, A. and Tew, J. G.,** Follicular dendritic cells in the alternative antigen transport pathway: microenvironment, cellular events, age and retrovirus related alterations. *Semin. Immunol.* 1992. **4:** 257–265.

6 **Tew, J. G., Kosco, M. H., Burton, G. F., and Szakal, A. K.,** Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* 1990. **117:** 185–211.

7 **Qin, D., Wu, J., Vora, K. A., Ravetch, J. V., Szakal, A. K., Manser, T. and Tew, J. G.,** Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. *J. Immunol.* 2000. **164:** 6268–6275.

8 **Yoshida, K., van den Berg, T. K. and Dijkstra, C. D.,** Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR gamma II-mediated immune-complex trapping. *Immunology* 1993. **80:** 34–39.

9 **Papamichail, M., Gutierrez, C., Embling, P., Johnson, P., Holborow, E. J. and Pepys, M. B.,** Complement dependence of localization of aggregated IgG in germinal centers. *Scand. J. Immunol.* 1975. **4:** 343–347.

10 **Yoshida, K., van den Berg, T. K. and Dijkstra, C. D.,** Two different mechanisms of immune-complex trapping in the mouse spleen during immune responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1993. **329:** 377–382.

11 **Klaus, G. G. and Humphrey, J. H.,** The generation of memory cells. I. The role of C3 in the generation of B memory cells. *Immunology* 1977. **33:** 31–40.

12 **Szakal, A. K., Kosco, M. H. and Tew, J. G.,** A novel in vivo follicular dendritic cell-dependent iccosome-mediated mechanism for delivery of antigen to antigen-processing cells. *J. Immunol.* 1988. **140:** 341–353.

13 **Kosco, M. H., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. *J. Immunol.* 1988. **140:** 354–360.

14 **Tew, J. G., Wu, J., Fakher, M., Szakal, A. K. and Qin, D.,** Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T cell help. *Trends Immunol.* 2001. **22:** 361–367.

15 **Qin, D., Wu, J., Carroll, M. C., Burton, G. F., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** Evidence for an important interaction between a complement-derived CD21 ligand on follicular dendritic cells and CD21 on B cells in the initiation of IgG responses. *J. Immunol.* 1998. **161:** 4549–4554.

16 **Fearon, D. T. and Carter, R. H.,** The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1995. **13:** 127–149.

17 **Chen, Z., Koralov, S. B. and Kelsoe, G.,** Regulation of humoral immune responses by CD21/CD35. *Immunol. Rev.* 2000. **176:** 194–204.

18 **Schnizlein, C. T., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** Follicular dendritic cells in the regulation and maintenance of immune responses. *Immunobiology* 1984. **168:** 391–402.

19 **Tew, J. G., Wu, J., Qin, D., Helm, S., Burton, G. F. and Szakal, A. K.,** Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol. Rev.* 1997. **156:** 39–52.

20 **Tsiagbe, V. K., Inghirami, G. and Thorbecke, G. J.,** The physiology of germinal centers. *Crit. Rev. Immunol.* 1996. **16:** 381–421.

21 **Thorbecke, G. J., Amin, A. R. and Tsiagbe, V. K.,** Biology of germinal centers in lymphoid tissue. *FASEB. J.* 1994. **8:** 832–840.

22 **Szakal, A. K., Holmes, K. L. and Tew, J. G.,** Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology. *J. Immunol.* 1983. **131:** 1714–1727.

23 **Tew, J. G., Mandel, T. E. and Miller, G. A.,** Immune retention: immunological requirements for maintaining an easily degradable antigen in vivo. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1979. **57:** 401–414.

24 **Tew, J. G., Kosco, M. H. and Szakal, A. K.,** The alternative antigen pathway. *Immunol. Today* 1989. **10:** 229–232.

25 **Haley, S. T., Tew, J. G. and Szakal, A. K.,** The monoclonal antibody FDC-M1 recognizes possible follicular dendritic cell precursors in the blood and bone marrow. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995. **378:** 289–291.

26 **Smith, J. P., Kosco, M. H., Tew, J. G. and Szakal, A. K.,** Thy-1-positive tingible body macrophages (TBM) in mouse lymph nodes. *Anat. Rec.* 1988. **222:** 380–390.

27 **Taylor, P. R., Pickering, M. C., Kosco-Vilbois, M. H., Walport, M. J., Botto, M., Gordon, S. and Martinez-Pomares, L.,** The follicular dendritic cell-restricted epitope, FDC-M2, is complement C4; localization of immune complexes in mouse tissues. *Eur. J. Immunol.* 2002. **32:**1883–1896

28 **Berek, C. and Ziegner, M.,** The maturation of the immune response. *Immunol. Today* 1993. **14:** 400–404.

29 **MacLennan, I. C. and Gray, D.,** Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. *Immunol. Rev.* 1986. **91:** 61–85.

30 **Schnizlein, C. T., Kosco, M. H., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** Follicular dendritic cells in suspension: identification, enrichment, and initial characterization indicating immune complex trapping and lack of adherence and phagocytic activity. *J. Immunol.* 1985. **134:** 1360–1368.

31 **Nagaki, K., Hiramatsu, S., Inai, S. and Sasaki, A.,** The effect of aging on complement activity (CH50) and complement protein levels. *J. Clin. Lab. Immunol.* 1980. **3:** 45–50.

32 **Fukuoka, Y., Seino, J., Okuda, T. and Tachibana, T.,** Development of a hemolytic assay for mouse complement components in sera and the variation of their levels with age. *Tohoku J. Exp. Med.* 1982. **137:** 79–90.

33 **Oswald, I. P., Lantier, F. and Bourgy, G.,** Classical and alternative pathway haemolytic activities of ovine complement: variations with age and sex. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1990. **24:** 259–266.

34 **Tew, J. G., DiLosa, R. M., Burton, G. F., Kosco, M. H., Kupp, L. I., Masuda, A. and Szakal, A. K.,** Germinal centers and antibody production in bone marrow. *Immunol. Rev.* 1992. **126:** 99–112.

35 **Burton, G. F., Conrad, D. H., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** Follicular dendritic cells and B cell costimulation. *J. Immunol.* 1993. **150:** 31–38.

36 **Ghia, P., Melchers, F. and Rolink, A. G.,** Age-dependent changes in B lymphocyte development in man and mouse. *Exp. Gerontol.* 2000. **35:** 159–165.

37 **Globerson, A. and Effros, R. B.,** Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol. Today* 2000. **21:** 515–521.

38 **Klinman, N. R. and Thorbecke, G. J.,** Aging associated changes in the generation and development of B cell memory. *Int. Rev. Immunol.* 1995. **12:** 5–12.

39 **Linton, Phyllis-Jean,** *The status of progenitors of memory B cells in aged mice*, Vol. 4. Liebert, La Jolla 1993, pp 35–46.

40 **Garg, M., Luo, W., Kaplan, A. M. and Bondada, S.,** Cellular basis of decreased immune responses to pneumococcal vaccines in aged mice. *Infect. Immun.* 1996. **64:** 4456–4462.

41 **Burton, G. F., Kosco, M. H., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** Iccosomes and the secondary antibody response. *Immunology* 1991. **73:** 271–276.

42 **Kosco, M. H., Pflugfelder, E. and Gray, D.,** Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro. *J. Immunol.* 1992. **148:** 2331–2339.

43 **Wu, J., Qin, D., Burton, G. F., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** Follicular dendritic cell-derived antigen and accessory activity in initiation of memory IgG responses in vitro. *J. Immunol.* 1996. **157:** 3404–3411.

44 **Maeda, K., Matsuda, M., Imai, Y., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** An immunohistochemical study of the phenotype of murine follicular dendritic cells (FDC). *Dendritic Cells* 1992. **1:** 23–30.

45 **Balogh, P., Aydar, Y., Tew, J. G. and Szakal A. K.,** Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. *Cell. Immunol.* 2001. **214:**45–53.

46 **Monfalcone, A. P., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** Increased leukocyte diversity and responsiveness to B cell and T cell mitogens in cell suspensions prepared by enzymatically dissociating murine lymph nodes. *J. Leukoc. Biol.* 1986. **39:** 617–628.

47 **Helm, S. L., Burton, G. F., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** Follicular dendritic cells and the maintenance of IgE responses. *Eur. J. Immunol.* 1995. **25:** 2362–2369.

Correspondence: Andras K. Szakal, Department of Anatomy and Neurobiology, Box 980709, VCU/MCV, Richmond, VA 23298, USA
Fax: +1-804-828-9477
e-mail: aszakal@hsc.vcu.edu

The Journal of Immunology

Altered Regulation of FcγRII on Aged Follicular Dendritic Cells Correlates with Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif Signaling in B Cells and Reduced Germinal Center Formation[1]

Yüksel Aydar,* Péter Balogh,* John G. Tew,† and Andras K. Szakal[2]*

Aging is associated with reduced trapping of Ag in the form of in immune complexes (ICs) by follicular dendritic cells (FDCs). We postulated that this defect was due to altered regulation of IC trapping receptors. The level of FDC-M1, complement receptors 1 and 2, FcγRII, and FDC-M2 on FDCs was immunohistochemically quantitated in draining lymph nodes of actively immunized mice for 10 days after Ag challenge. Initially, FDC FcγRII levels were similar but by day 3 a drastic reduction in FDC-FcγRII expression was apparent in old mice. FDC-M2 labeling, reflecting IC trapping, was also reduced and correlated with a dramatic reduction in germinal center (GC) B cells as indicated by reduced GC size and number. Nevertheless, labeling of FDC reticula with FDC-M1 and anti-complement receptors 1 and 2 was preserved, indicating that FDCs were present. FDCs in active GCs normally express high levels of FcRs that are thought to bind Fc portions of Abs in ICs and minimize their binding to FcRs on B cells. Thus, cross-linking of B cell receptor and FcR via IC is minimized, thereby reducing signaling via the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif. Old FDCs taken at day 3, when they lack FcγRII, were incapable of preventing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif signaling in wild-type B cells but old FDCs stimulated B cells from FcγRIIB$^{-/-}$ mice to produce near normal levels of specific Ab. The present data support the concept that FcR are regulated abnormally on old FDCs. This abnormality correlates with a reduced IC retention and with a reduced capacity of FDCs to present ICs in a way that will activate GC B cells. ***The Journal of Immunology,*** **2003, 171: 5975–5987.**

The follicular dendritic cells (FDCs)[3] reside in the light zone of secondary lymphoid follicles, where their dendritic processes interdigitate and form a three-dimensional network, an FDC reticulum (1-4). FDCs function in capture and long-term retention of immune complexes (ICs) (5–7), the blocking of apoptosis, the survival of specific B cells (8, 9), and the promotion of the development of potent high-affinity (10) recall responses (11, 12). The capture and retention of ICs are mediated by an array of cell surface receptors that include FcγRII (13, 14) and complement receptors (complement receptors 1 and 2 (CR1/2)) (15–17).

Senescence leads to a pronounced reduction in the secondary humoral immune response, the appearance of atrophic FDCs (18) that trap and retain little ICs, produces few iccosomes, and induces a reduced number of germinal center (GC) B cells (19). Although there is a marked age-related depression in GC development and specific Ab production, the ratio of the FDC reticulum to GC numbers remains 1:1 (18–21), emphasizing the dependence of GC development on FDCs even in aging.

FcγRII and CR2 (CD21) exist on both FDCs and B cells and are involved in important ligand-receptor interactions including FDC-FcγR-Fc in IC and FDC-CD21 ligand (CD21L)-B cell CD21. FDC-CD21L provides B cells with a critical costimulatory signal and FDC-FcγRII minimizes coligation of B cell receptor (BCR) and B cell-FcR (11, 13–17, 22). FcγRII is highly expressed on FDCs in secondary follicle GCs and the expression pattern of FcγRII on FDC reticula supports the development of a potent Ab response (11, 13, 23). The expression of FcγRII on FDCs in GCs is critical for FDCs to retain and mediate the conversion of ICs to a highly immunogenic form and for the generation of strong recall responses (11, 13). Moreover, FcγRII promotes the maturation of the FDC reticulum (24); FcγRIIB$^{-/-}$ mice show a substantial delay in the development of FDC reticula (24). The ability of FDCs from FcγRIIB$^{-/-}$ mice to augment Ag-specific IgG production by wild-type B cells (11, 13) or when incubated with the anti-FcγRII mAb 2.4G2 is markedly depressed. Furthermore, it appears that engagement of Ig-Fc with numerous FcγRII on FDCs decreases the chances of signaling B cells via the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) induced by cross-linking BCR and B cell FcγRII via Ab-Ag complexes (J.G.T., unpublished data). Thus, FDCs minimize a negative signal to B cells.

Although the phenomenon of age-associated reduction in IC trapping in old mice is well known (18, 19), the cellular and molecular bases for this defect have not been defined. Numerous studies indicate the importance of FcγRII and CR1/2 in IC trapping

*Department of Anatomy and Neurobiology, The Immunology Group, and †Department of Microbiology and Immunology, Virginia Commonwealth University, Medical College of Virginia, Richmond, VA 23298

Received for publication October 24, 2002. Accepted for publication September 22, 2003.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[1] This work was supported by National Institutes of Health Grant AG-17063. Y.A. is the recipient of a scholarship from the Ministry of National Education in Turkey.

[2] Address correspondence and reprint requests to Dr. Andras K. Szakal, Department of Anatomy and Neurobiology, MCV/VCU, 1101 East Marshall Street, Richmond, VA 23298. E-mail address: aszakal@hsc.vcu.edu

[3] Abbreviations used in this paper: FDC, follicular dendritic cell; IC, immune complex; GC, germinal center; CD21L, CD21 ligand; CR1/2, complement receptors 1 and 2; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; PNA, peanut agglutinin; SHIP, Src homology 2-containing inositol phosphatase.

Copyright © 2003 by The American Association of Immunologists, Inc.

0022-1767/03/$02.00

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

and mediation of costimulatory signals to B cells in humans as well as mice (3, 7, 9, 11, 13). However, potential age-related changes in the function and molecular interactions of the FcγRII and CR1/2 have not been determined.

Age-related changes in IC trapping, reductions in the FDC reticulum, GC numbers, and size prompted the hypothesis that in old mice reduced IC retention is due to a defect in expression of surface receptors that involve IC trapping. To test this hypothesis, lymph node sections of actively immunized mice were immunohistochemically quantitated for FcγRII and CR1/2 receptors, for FDC reticulum size (anti-FDC-M1), for the capacity to trap ICs (anti-FDC-M2), and for GCs (peanut agglutinin (PNA)). The results showed that aging reduced the expression of FcγRII on FDCs by day 3 after Ag challenge that correlated with the reduced trapping of ICs (FDC-M2 reactivity). In accordance with these results, old FDCs taken at day 3 could not prevent ITIM signaling and Src homology 2-domain-containing inositol phosphatase (SHIP) phosphorylation because of the dramatic age-related reduction of FcγRII expression.

Materials and Methods

Animals

BALB/c mice at 2–3 and 20–21 mo of age were purchased from the National Institute on Aging Contract Facility (Harlan, Indianapolis, IN) and maintained under specific pathogen-free conditions. The mice were housed in standard plastic shoebox cages with filter tops. Food and water were supplied ad libitum. The young mice were used between 2 and 3 mo of age and old mice were used between 21 and 22 mo of age. The mice were handled in accordance with Virginia Commonwealth University Animal Care and Use guidelines.

Immunizations

As described previously for active immunization (25, 26), mice received an initial 0.1-ml injection s.c. behind the nape of the neck consisting of 200 μg/ml aluminum potassium sulfate (A7167; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), precipitated OVA (A5503; Sigma-Aldrich), and 5×10^8 heat-killed *Bordetella pertussis*. Two weeks later, the mice were given a booster immunization of 50 μg of OVA i.p. and by s.c. injection 5 μg of OVA into each of the front legs and hind feet. Finally, all mice were challenged at least 2 wk after the last immunization by s.c. injection of 5 μg of OVA into each of the front legs and hind feet and used at 0, 1, 3, 5, and 10 days after the challenge.

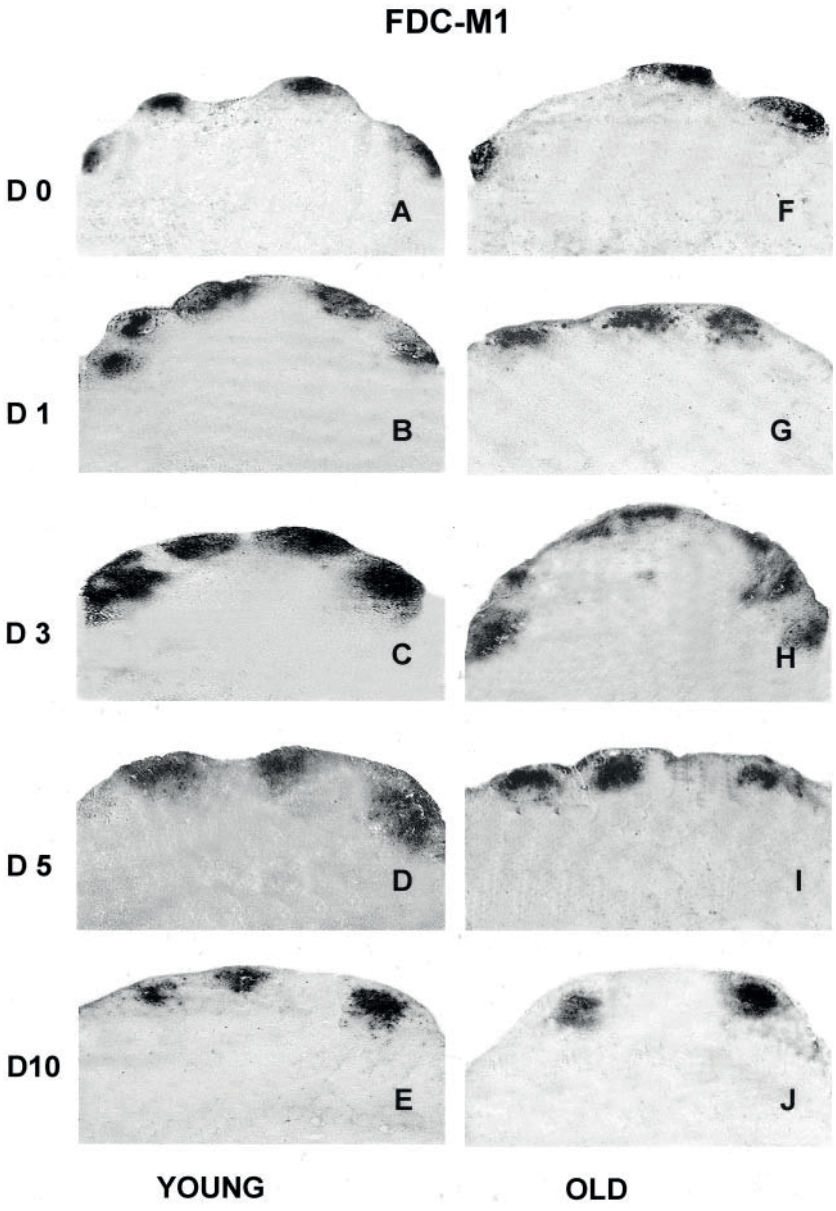


FIGURE 1. Representative light micrographs illustrating the kinetics of immunohistochemical labeling of FDC reticula in draining axillary lymph nodes of actively immunized young (6–8 wk) and old (22 mo) mice with FDC-M1. The same relationships were apparent in brachial and popliteal lymph nodes. Mice were primed and boosted with OVA and 3 wk after the final booster the animals were challenged with 5 μg of OVA (day 0). D, Day. Magnification, ×120.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

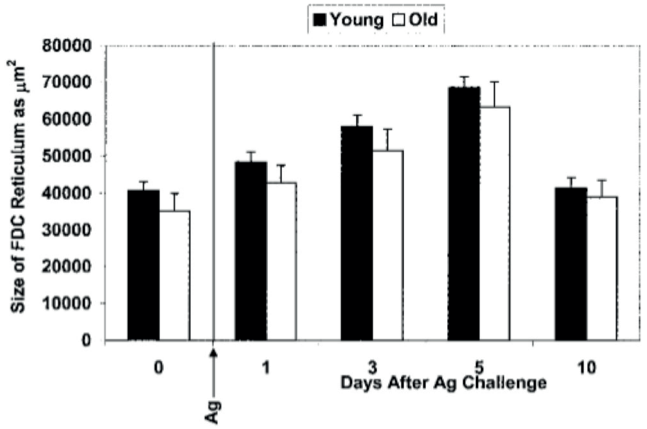


FIGURE 2. Size of the average FDC reticulum in the draining lymph nodes of young and old mice as assessed by FDC-M1 labeling. Young (■) and old (□) mice were actively immunized and challenged with OVA as described for the animals in Fig. 1. The averages were calculated using data from three to six mice per day. Note that FDC-M1-positive FDC reticula were essentially identical in both young and old mice and showed about a 30% increase in size during the first 10 days of GC response. The data represent the mean in square micrometers ± SEM.

Abs and other reagents

The rat mAbs against CR1/2 (CD21/35, clone 7G6), CD16/32 (clone 2.4G2), and biotinylated mouse anti-rat κ-chain mAb (MRK-1) were obtained from BD PharMingen (San Diego, CA). Low-Tox rabbit complement was purchased from Cedarlane Laboratories (Westbury, NY). The normal rat serum, phenylhydrazine-HCl, the PNA lectin conjugated with peroxidase (PNA-HRP), sodium orthovanadate, sodium fluoride, sodium deoxycholic acid, Igepal CA-630, PMSF, and the streptavidin-peroxidase (streptavidin-HRP) were obtained from Sigma-Aldrich. Rabbit anti-mouse SHIP-145/135 (SHIP-1α, 145 kDa; SHIP-1β, 135 kDa), HRP-conjugated anti-phosphotyrosine (4G10), and protein A agarose were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Peroxidase-conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG (H + L) and affinipure F(ab′)$_2$ goat anti-mouse IgG (H + L) were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). The FDC-M1 and FDC-M2 hybridoma cell lines were generously provided by Dr. M. Kosco-Vilbois (Serono, Switzerland), and their supernatant was used as primary Ab.

IC preparation and incubation of FDCs with IC and complement

The FDCs were prepared and incubated with ICs and complement as described previously by Aydar et al. (27). In brief, OVA and affinity-purified anti-OVA were used to make ICs for use in cultures. A final ratio of 1 ng/ml OVA to 6 ng/ml anti-OVA was used to make up the ICs in Ag

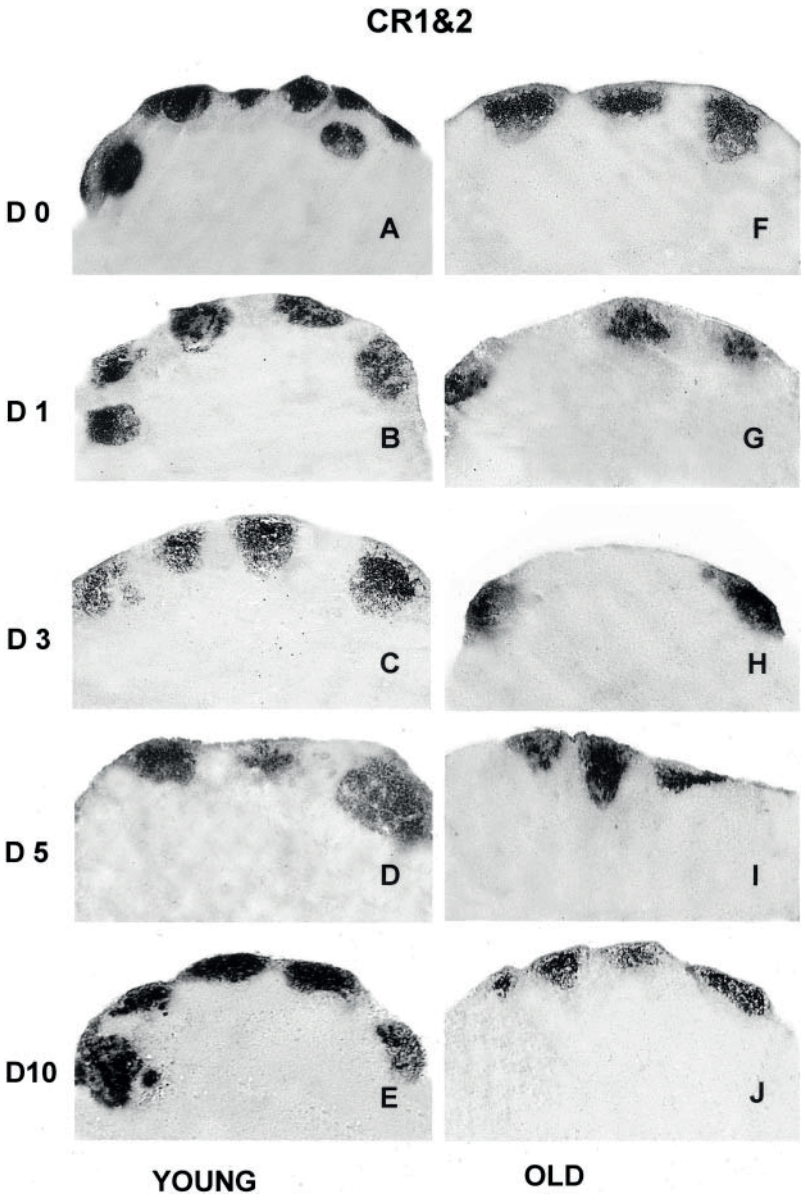


FIGURE 3. Representative light micrographs illustrating the kinetics of immunohistochemical labeling of FDC reticula in draining axillary lymph nodes of actively immunized young (6–8 wk) and old (22 mo) mice with anti-CR1/2 (CD21/35, clone 7G6). The same relationships were apparent in brachial and popliteal lymph nodes. These sections are from the same mice described in Figs. 1 and 2. D, Day. Magnification, ×120.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

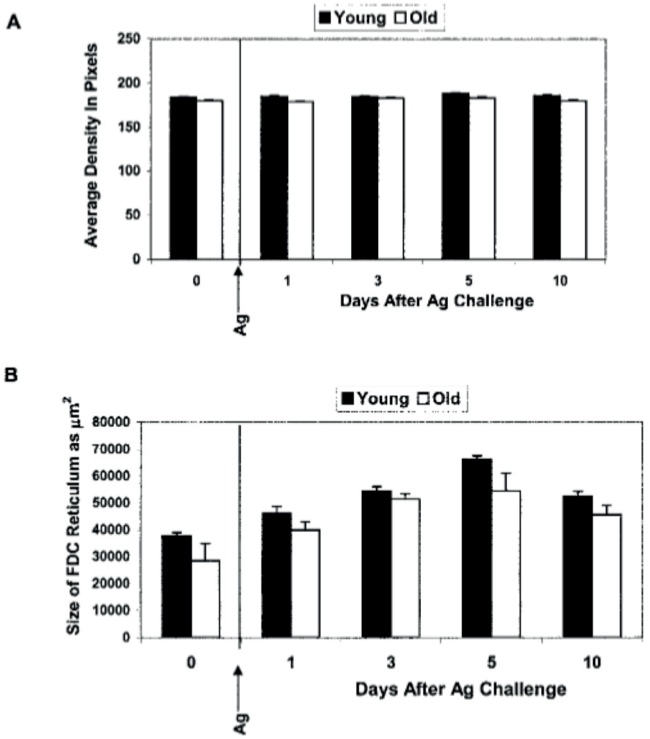


FIGURE 4. The density and size of average FDC reticulum labeling in the draining axillary lymph nodes of young and old mice as assessed by anti-CR1/2. Young (■) and old (□) mice were actively immunized and challenged with OVA. These are the same lymph nodes as those shown in the preceding figures from three to six mice per group. *A,* Note that the labeling densities of FDC reticula were essentially identical in young and old mice. The data represent the mean ± SEM in color value of pixels. *B,* Note that FDC-M1-positive FDC reticula were essentially identical in size in both young and old mice. The data represent the mean in square micrometers ± SEM.

excess. Young and old FDCs were incubated with ICs for 2 h in Low-Tox rabbit complement to load FDCs with CD21L.

Cell cultures and ELISA

Cell cultures were set up by adding enriched FDC preparations to B and T memory lymphocytes as described by Aydar et al. (27). In brief, FDCs were isolated from lymph nodes (axillary, lateral axillary, inguinal, popliteal, mesenteric, and para-aortic) of normal young adult mice by using a modification of a previously described procedure (26). Three days before isolation, the mice were exposed to whole body irradiation (600 rad, Ce^{137} source). The irradiation dose does not interfere with FDC accessory functions but eliminates many of the B and T cells, which otherwise form clusters with FDCs and decrease the FDC purity (28). Single-cell suspensions were prepared from the lymph nodes by using enzymatic digestion. Each lymph node capsule was opened using two 26-gauge needles, then the lymph nodes were placed in an enzyme mixture consisting of 1 ml of collagenase D (16 mg/ml, C-1088882; Roche, Basel, Switzerland), 0.5 ml of DNase I (5000 U/ml, D-4527; Sigma-Aldrich), and 0.5 ml of DMEM supplemented with 20 mM HEPES, 2 mM glutamine, 50 μg/ml gentamicin, and MEM nonessential amino acids (Life Technologies, Rockville, MD). After 30 min at 37°C in a CO_2 incubator, the medium and released cells were removed and transferred to a 15-ml conical centrifuge tube containing 5 ml of DMEM with 20% FCS and placed at 4°C. The remaining tissue was subjected to a second 30-min digestion in a fresh aliquot of enzyme mixture and the cells were collected as before. Isolated cells were gently layered on a continuous 50% Percoll gradient and centrifuged for 25 min at 700 × *g*. The low-density (1.050–1.060 g/ml) fraction of cells containing the FDCs was collected, washed by centrifugation at 400 × *g*, and resuspended in DMEM with 10% FCS, then incubated at 37°C for 1h in a small tissue culture dish (Costar 3035; Costar, Cambridge, MA) to deplete adherent cells. After incubation, the nonadherent cells were collected, washed, and resuspended in DMEM with 10% FCS. OVA-specific IgG was measured by means of a solid-phase ELISA as previously described (13, 26, 29).

Immunohistochemistry

Young and old mice were actively immunized with OVA and challenged 0, 1, 3, 5, and 10 days before use. After removal, the draining lymph nodes (axillary, brachial, and popliteal) were pooled and frozen in CryoForm-embedding medium (IEC, Needham Heights, MA) and frozen sections of 10-μm thickness were cut on a Leitz (1720 Digital) cryostat and air dried. Five representative sections, three from the center and one from each side of the lymph nodes were collected and processed together for the quantitative analysis. Following acetone fixation, the sections were rehydrated and the endogenous peroxidase activity was quenched with PBS containing 0.1% phenylhydrazine-HCl. After washing, the sections were saturated with 10% BSA, then incubated with unlabeled rat mAbs. The bound Abs were detected using biotinylated mouse anti-rat κ-chain mAb followed by incubating the sections with streptavidin-HRP conjugate. The reaction was visualized using 3-amino-9-ethylcarbazole in a 0.1 M sodium acetate buffer containing 0.03% H_2O_2 substrate.

Analyses of immunohistochemistry results

BIOQUANT NOVA Advanced Image Analysis software (R&M Biometrics, Nashville, TN) was used to analyze the immunohistochemistry studies. BIOQUANT NOVA is the core measurement software for image analysis applications. It measures area, length, number, position, density, and a range of more specialized parameters.

Setting the threshold. A threshold is a set for red, green, and blue intensity values that are used to distinguish objects of interest in an image. The word "threshold" also refers to the colorful highlighting on the screen that results from setting a threshold range. Initially, we set an arbitrary threshold that was the best threshold possible for the objects of interest. The same threshold was used strictly throughout the measurements to enable a reliable comparison of average density for CR1/2, FcγRII, and FDC-M2 staining, FDC reticulum size for FDC-M1, CR1/2, FcγRII, and FDC-M2, and PNA-positive GC size for PNA staining between young and old mice on successive days after Ag challenge. For each measurement, the objects of interest were selected by drawing an enclosed circle and filling it with the predefined threshold.

Average density measurement. Density measurements in a color imaging system (like BIOQUANT NOVA) are done by examining three channels (red, green, and blue), which comprise a color image. All three color channels may be used when setting a threshold to define the objects of interest to be measured. But, the density measurement is made only on the channel designated in the density array's comment. The default (and most commonly used) channel is the green channel since it most closely approximates the range of colors perceptible by the human eye. The average density analyses for FDC-M1, CR1/2, FcγRII, and FDC-M2 were done using average density. Average density looks at a group of pixels and measures their average color value. It is the most common way to compare the amount of light-absorbing stain present in one object to others. Computers work on a color scale from 0 to 255. Zero is black and 255 is the brightest color. Note that this is backwards from conventional "absorption" scales where darker regions have larger data values than lighter regions. To make the data easily traceable for the readers, we reversed the relative density assignments by subtracting the measured values from the 255 so that 0 corresponds to white and 255 corresponds to black (darker regions have larger data values than lighter regions in our illustrations).

Area measurement. The area array records the area of selected objects in a single field or across multiple fields. The system measures the selected areas as square micrometers. When the density threshold settings and size settings are satisfactory, the areas are counted using "Object Mode for all Objects" comment. For the present studies, we measured FDC reticulum size for FDC-M1, CR1/2, FcγRII, and FDC-M2. We also measured PNA-positive GC size for PNA. FDC reticulum size, labeled with FDC-M1, CR1/2, FcγRII, or FDC-M2, was determined by using the automeasurement mode of BIOQUANT NOVA, filling the FDC reticulum with predefined threshold that most closely approximates the borders of FDC reticulum. PNA-positive GC size was determined by using the manual measurement mode of BIOQUANT NOVA, which allows drawing of a circle around labeling the GC, then measures the inside of the circle.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

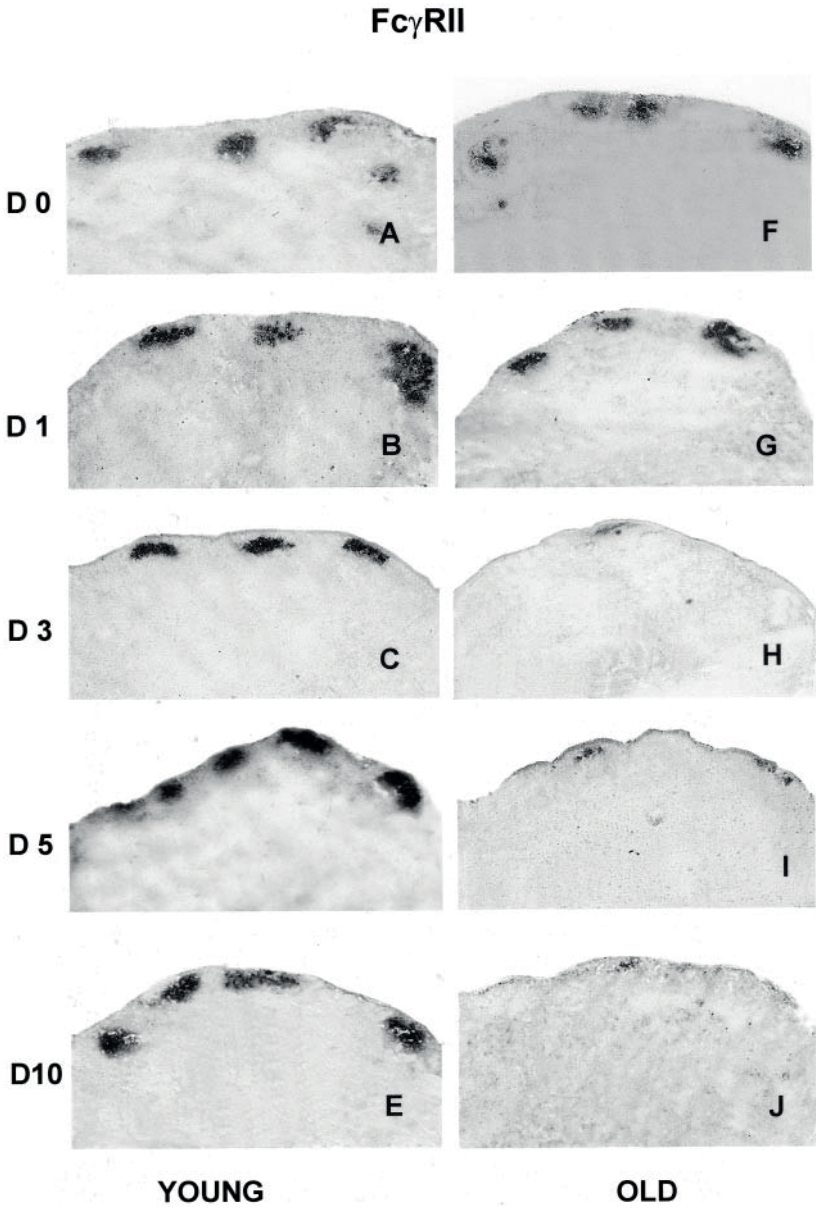


FIGURE 5. Representative light micrographs illustrating the kinetics of immunohistochemical labeling of FDC reticula in draining axillary lymph nodes of actively immunized young and old mice with anti-FcγRII (CD16/32, clone 2.4G2). These are the same lymph nodes as those shown in the preceding figures. Note the striking decrease in FDC reticula after day 1 in the aged FDCs (D, day). The same relationships were apparent in brachial and popliteal lymph nodes. Magnification, ×120.

Determination of average density, average FDC reticulum size, and average GC size

Draining lymph nodes (two axillaries, two brachial, and two popliteal) were sectioned and used to quantitate average density, average FDC reticulum size, and average GC size per follicle. The average density for FDC-M1, CR1/2, FcγRII, and FDC-M2 were done by adding up the densities of follicles in the draining lymph nodes and dividing the sum by the number of reticula. Similarly, the FDC reticulum sizes for FDC-M1, CR1/2, FcγRII, and FDC-M2 were measured by summing up the FDC reticulum size of follicles in the draining lymph nodes and dividing the sum by the number of FDC reticula. The average PNA-positive GC size was determined by adding up PNA-positive GC sizes in follicles in all draining lymph nodes and then dividing the sum by the number of GCs examined.

Cell culture and stimulation

A20 cells (mouse B lymphoma cell line) were obtained through American Type Culture Collection (Manassas, VA) and were grown in DMEM supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (HyClone, Logan, UT), 20 mM HEPES, 2 mM glutamine, 50 μg/ml gentamicin, and MEM-nonessential amino acids. Cells were harvested and washed with cold HBSS and then the cells were equilibrated for 30 min at 37°C. To study the inhibition of SHIP phosphorylation by FDCs, 2×10^7 A20 cells were cocultured with young or old FDCs for 30 min at 37°C and then the cells were stimulated with 10 μg/ml goat anti-mouse BCR Abs for 5 min at 37°C.

Preparation of cell lysates

The cocultured cells were lysed in cold 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) supplemented with 0.5% Nonidet P-40, 100 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4, and protease and phosphatase inhibitors (100 mM aprotinin, 5 μM leupeptin, and 200 mM PMSF) for 30 min at 4°C, with agitation. The cell lysates were centrifuged at 12,000 × *g* for 30 min at 4°C, and the soluble fractions were collected for immunoprecipitation of SHIP.

Immunoprecipitation of SHIP and Western blotting analysis

The cell lysates were incubated with anti-SHIP (2 μg/ml) overnight at 4°C. To precipitate the Ab-associated proteins, the lysates were incubated with 100 μl of protein A-coated beads (protein A agarose) overnight at 4°C and beads were recovered by centrifugation at 4000 × *g* for 5 min at 4°C and washed five times with ice-cold lysis buffer (radioimmunoprecipitation buffer). All washes were performed with protease and phosphatase inhibitors. Bound proteins were eluted from the beads by boiling for 5 min in 50 μl of Laemmli sample buffer containing 50 μl of 2-ME/ml and centrifuged to remove the beads. The supernatants were collected and kept at −80°C until used. The eluted proteins were separated by SDS-PAGE (7% (w/v)

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

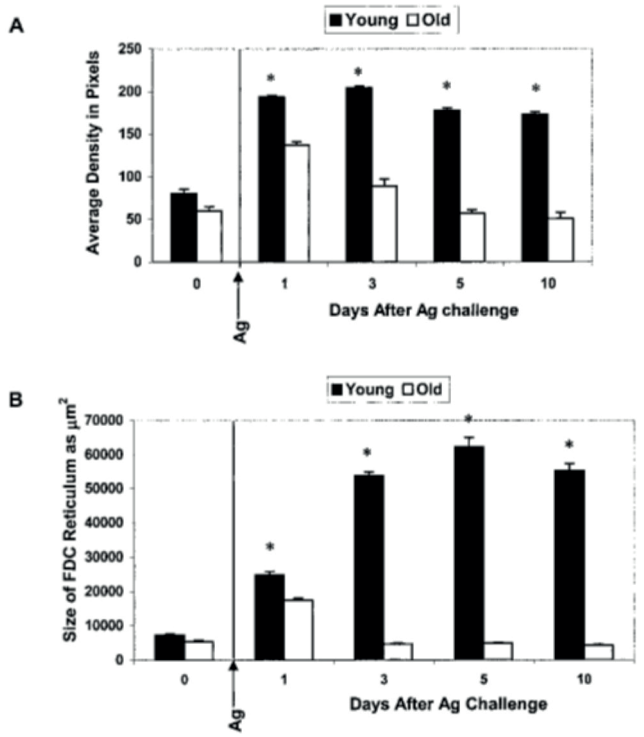


FIGURE 6. The density and size of average FDC reticulum labeling in the draining axillary lymph nodes of young and old mice as assessed by anti-FcγRII (CD16/32, clone 2.4G2). Young (■) and old (□) were actively immunized and challenged with OVA. These are the same lymph nodes (three to six mice per group) as those shown in the preceding figures. *A,* Note the striking decline in labeling intensity from day 1 in the reticula from aged FDCs. The data represent the mean ± SEM in color value of pixels and significant age-related differences are indicated by the asterisk (*, $p < 0.05$). *B,* Note that FcγRII-positive FDC reticulum size was significantly reduced in old mice compared with young and remained very small during the 3, 5, and, 10 days of the GC response. The data represent the mean in square micrometers ± SEM and significant age-related differences are indicated by the asterisk (*, $p < 0.0001$).

gel) and electrotransferred to nitrocellulose membranes (Protran BA 79). The blots were blocked with 5% (w/v) BSA in a buffer containing Tween 20 plus TBS overnight at 4°C and probed with HRP-conjugated anti-phosphotyrosine (4G10) Ab. Signals were detected using the ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). For loading controls, the membranes probed with HRP-conjugated anti-phosphotyrosine Ab were washed twice for 10 min in TBST after signal detection. Then the membranes were stripped with 0.1 M glycine, 50 mM KCl in distilled H_2O at pH 2.2 for 15 min at room temperature to remove the anti-phosphotyrosine. Stripped membranes were incubated with rabbit anti-mouse SHIP (2 μg/ml) for overnight at 4°C and labeled with HRP-conjugated secondary Abs. Signals were detected using the ECL kit.

Western blot data quantitation

The ECL signal was quantitated using a scanner and a densitometry program (Scion Image, Frederick, MD). The films were exposed to nitrocellulose membrane for 20 min at ambient temperature in a dark room and were developed using a Kodak XOMAT developer (Kodak, Rochester, NY). The films were scanned and the interest of protein bands was selected using the Scion Image software. The program measured the protein bands as mean density of all pixels.

Results

In old mice, FDC reticula develop poorly when assessed by amount of Ag trapped, which is clearly reduced and contain reduced amount of immune complexes (18, 19). To understand the aberrant development of FDC reticula and their reduced capacity to trap IC in old mice, the present studies were designed to obtain a quantitative assessment of FDC-associated molecules involved in FDC reticulum development in the draining lymph nodes of young and old mice. The average density of molecules in an FDC reticulum was determined for FDC-M1, CR1/2, FcγRII, and FDC-M2 staining during the GC reaction in response to Ag challenges. The lymph nodes were evaluated at time 0 (pre-existing FDC reticula 3 wk after primary immunization) and then at days 1, 3, 5, and 10 after Ag injection. FDC reticulum size and PNA-positive GC size were expressed in square micrometers. Average density was expressed as average color value of the pixels in the region of the interest.

Kinetics of FDC-M1-positive FDC reticulum development

To determine the size of an average FDC reticulum, the FDC-specific mAb FDC-M1 was used. FDC-M1 is a murine follicular dendritic cell-reactive mAb that labels primarily the FDC reticula and some tingible body macrophages. Representative sections illustrating typical labeling patterns for FDC-M1 are presented in Fig. 1. The average reticulum size was quantitated using sections from three to six mice per group (Fig. 2). The pre-existing FDC-M1-positive FDC reticulum size was moderately large (~40,000 μm^2) at day 0 (3 wk after primary immunization) in these actively OVA-immunized young and old mice (Fig. 2). FDC-M1-positive FDC reticulum size enlarged gradually at days 1 and 3 and peaked at day 5 (~70,000 μm^2) in both young and old mice (Fig. 2). By day 10, FDC-M1-positive FDC reticulum size was reduced to pre-challenge level and became more compact both in young and old mice (Fig. 2). No significant size differences were found between young and old mice, suggesting the number of FDCs in the reticula of aged mice is not deficient.

Kinetics of CR1- and 2-positive FDC reticulum development

Since it is known that complement plays a significant role along with FcγRII in the trapping of ICs by FDCs, we examined the CR1/2 reactivity of FDCs in the reticula of draining lymph nodes using a mAb reactive with CR1/2. FDCs labeled intensely when compared with B cells (Fig. 3). The average density of CR1/2 staining, and the average size of CR1/2-positive FDC reticula were determined and results for old and young mice at days 0, 1, 3, 5, and 10 were indistinguishable (Fig. 4). The size of the pre-existing CR1/2- positive FDC reticula was moderately large (~38,000 μm^2) in both young and old mice at day 0 (Fig. 4*B*), but it increased and peaked at day 5 (~68,000 μm^2). By day 10, the CR1/2-positive FDC reticulum size slightly reduced and became more compact in both the young and old lymph nodes (Fig. 4*B*). Overall, there was no significant difference between the CR1/2-positive FDC reticulum size of young and old mice during the GC response and results were consistent with FDC-M1.

Kinetics of FcγRII-positive FDC reticulum development

We next examined whether age-related changes in the level of FcγRII expression were detectable using anti-FcγR mAb (clone 2.4G2) (Fig. 5). The rat mAb 2.4G2 recognizes both mouse FcγRII and FcγRIII. However, histochemistry studies using FcγRIIB$^{-/-}$ mice showed no labeling for the rat mAb 2.4G2 on FDCs, although FDC reticula were present in active GCs as indicted by a variety of other FDC markers and FcγRIII was present on other cells (13). The conclusion of this previous study was that FDCs have little if any FcγRIII and, thus, we attribute labeling of FDC reticula with 2.4G2 to be due to FcγRII-positive FDCs (13). Note the intense labeling of FDC reticula compared with B cell areas and a remarkable loss of labeling of the reticula in old mice after day 1 (Fig. 5). Morphometry showed that at 0 time the average density for FcγRII labeling was low for both young and old mice between (55 and 65

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

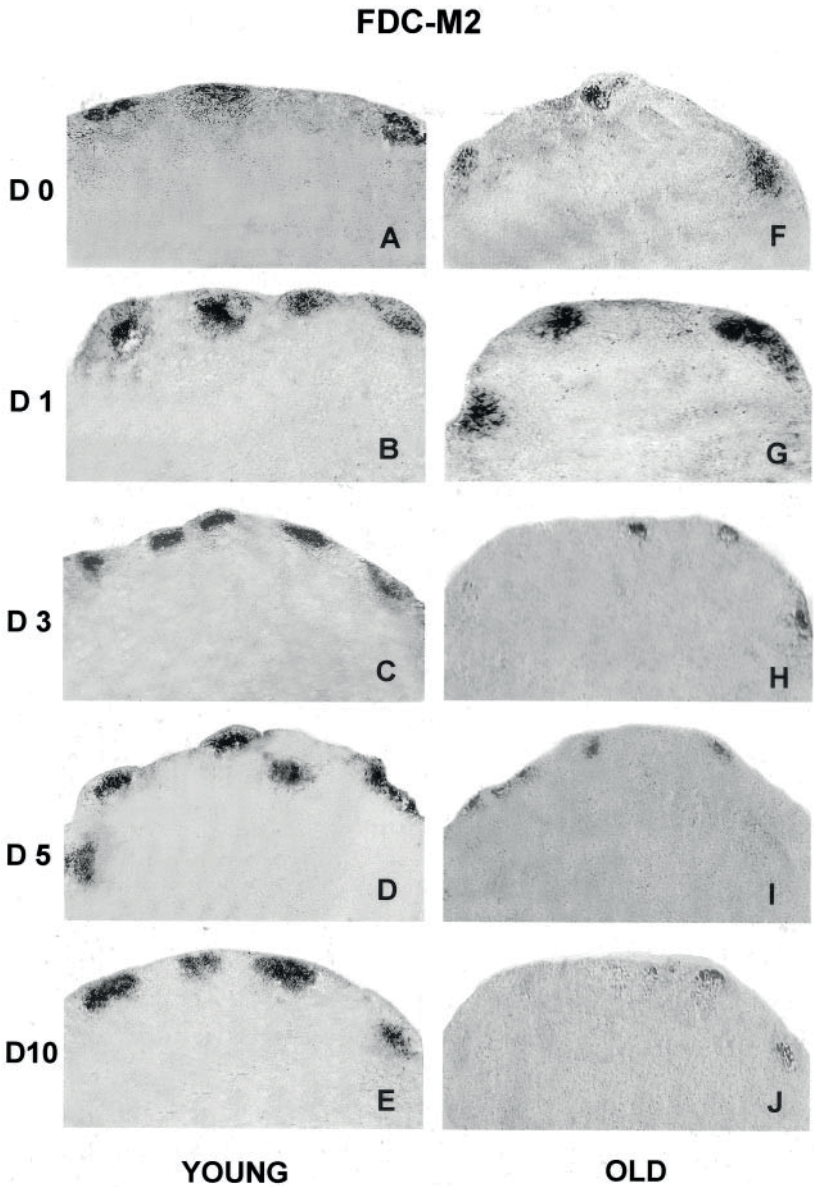


FIGURE 7. Representative light micrographs illustrating the kinetics of immunohistochemical labeling of FDC reticula in draining axillary lymph nodes of actively immunized young and old mice with FDC-M2. These are the same lymph nodes as those shown in the preceding figures. Note the striking decrease in FDC reticula after day 3 in the aged FDCs (D, day). The same relationships were apparent in brachial and popliteal lymph nodes. Magnification, ×120.

pixels) (Fig. 6*A*). The average density for FcγRII labeling, which reflects the amount of FcγRII on FDCs in the reticula, increased significantly by day 1 in both young and old mice and remained high in young mice between 194 and 173 pixels (Fig. 6*A*). In marked contrast, in old mice the average density rapidly dropped off and stayed low (between 137 and 51 pixels) during the rest of the FDC reticulum reaction (Fig. 6*A*).

The size of pre-existing FcγRII-positive FDC reticulum 3 wk after priming was small (~7,000 μm^2) (Fig. 6*B*) in comparison to 30,000–40,000 μm^2 for FDC-M1 and CR1/2 labeling, indicating that only a proportion of the FDC reticula labeled at day 0 both in young and old mice. Between days 0 and 1, there was a substantial ~3- fold increase in FcγRII-positive FDC reticulum size in both young and old mice. An additional ~2-fold increase occurred between days 1 and 3 in young mice (Fig. 6*B*). In contrast, in old mice the FDC reticulum size increased by ~3-fold between days 0 and 1, but the FDC reticulum size then dramatically decreased from 20,000 μm^2 and leveled off at 5,000 μm^2. This represents >10-fold deficit in FcγRII on FDCs in the reticula of aged mice at days 3, 5, and 10.

Kinetics of FDC-M2-positive FDC reticulum development

The reactivity of mAb FDC-M2 with FDCs is dependent on trapped ICs capable of fixing complement. FDC-M2 reacts specifically with the C4 fragment of complement associated with the FDC ICs (30). Thus, FDC-M2 labeling closely reflects the location of ICs on FDCs.

The kinetics of the FDC-M2 labeling was studied to obtain a functional parameter that reflects Ag localization that can be correlated with FcγRII and CR1/2 labeling of FDCs, both of which are functional in IC trapping. Representative sections showing FDC-M2 labeling of FDC reticula are shown in Fig. 7. The average densities of pre-existing FDC-M2-positive FDC reticula were rather high (100–110 pixels) at day 0 in both young and old mice (Fig. 8*A*). The average density for FDC-M2 labeling increased in young mice significantly by day 1 and remained high (between 175 and 210 pixels) at days 5 and 10. In contrast, in old mice the average density after a brief increase at day 1 (~150 pixels) rapidly dropped off and stayed low (at 60 pixels) after day 5 of the GC reaction (Fig. 8*A*).

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

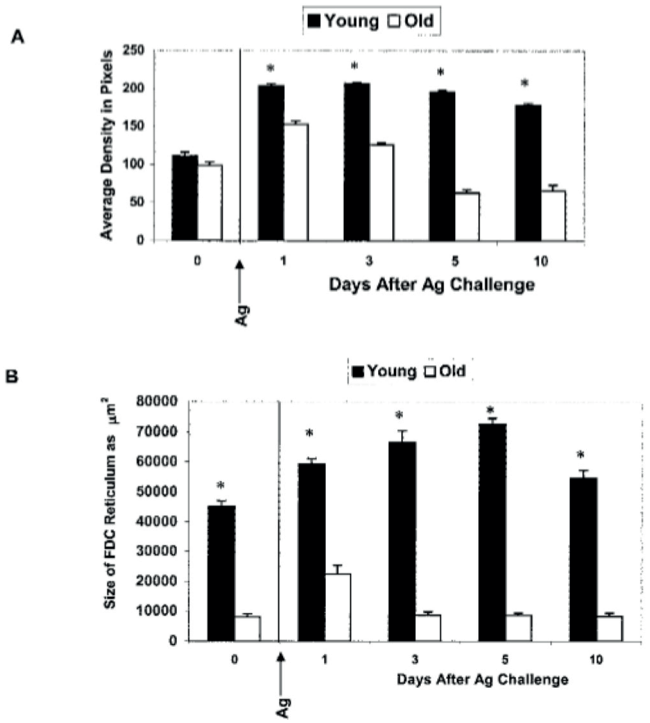


FIGURE 8. The density of average FDC reticulum labeling in the draining axillary lymph nodes of young and old mice as assessed by FDC-M2. Young (■) and old (□) were actively immunized and challenged with OVA. These are the same lymph nodes (three to six mice per group) as those shown in the preceding figures. *A,* Note that the average density for FDC-M2$^+$ FDC reticula in old mice showed a moderate increase 1 day after challenge with the Ag but started to diminish at day 3 and remained low for the rest of the GC response. In young mice, these values remained approximately twice as high as those of old mice. The data represent the mean ± SEM in color value of pixels and significant age-related differences are indicated by the asterisk (*, $p < 0.02$). *B,* Note that the FDC-M2-positive FDC reticulum size was significantly reduced in old mice compared with young mice and remained very small during the 3, 5, and 10 days of the GC response. The data represent the mean in square micrometers ± SEM and significant age-related differences are indicated by the asterisk (*, $p < 0.0001$).

The pre-existing FDC-M2-positive FDC reticulum size in young mice was significantly larger (45,285 μm^2) than that of old mice (8,194 μm^2) and was comparable to FDC-M1 and CR1/2 labeling (Fig. 8*B*). In young mice, the size of FDC-M2-positive FDC reticulum increased gradually and peaked at day 5 (72,623 μm^2) comparable to M1 and CR1/2 labeling. At day 10, FDC-M2-positive FDC reticulum size was slightly reduced and became more compact in young mice (Fig. 8*B*). In old mice, the size of FDC-M2-positive FDC reticulum increased from 8,194 μm^2 at day 0 to 22,573 μm^2 at day 1, but declined and leveled off at ~8,000 μm^2, representing greater than ~12-fold reduction in FDC reticulum size at days 3, 5, and 10 (Fig. 8*B*).

Kinetics of PNA-positive GC development

In the preceding studies, the development of the FDC reticulum was monitored. We reasoned that the response of the GC B cells to Ag provided by the FDCs could be measured by monitoring the development of PNA-positive GCs, since B cells labeling with PNA are activated and proliferating cells. Representative sections (Fig. 9) illustrating the PNA labeling of developing GCs are shown for the same group of young and old axillary lymph nodes from day 0 through day 10 of the GC response. The average GC size in the draining lymph nodes of young and old mice was determined and the values of responder draining lymph nodes were then plotted against time (Fig. 10). In young draining lymph nodes, the average pre-existing PNA-positive GC size at day 0 was small but much larger than an FDC reticulum. In young draining lymph nodes, there was a significant increase in mean GC size from day 1 to day 5 (Fig. 10). The size of de novo OVA challenge-induced GCs increased through day 5 in the young lymph nodes, but in old mice the size was only 15% of normal at days 5 and 10. The results indicate a general failure of Ag on old FDCs to stimulate GC B cells and are consistent with the lack of FcγRII and FDC-M2 labeling in old mice.

Comparison of FDC reticula and GC numbers in the pool of draining lymph nodes at day 5

Kinetic analysis of the average FDC reticulum or average GC in the pool of draining lymph nodes of young and old mice revealed some remarkable deficits in old mice. By day 5, the FDC reticula and GCs were well developed and in some cases the number of FDC reticula and GCs appeared to be reduced in old mice. Analysis of FDC reticula and GC number in the pool of draining lymph nodes (two axillaries, two brachial, and two popliteal) indicated between 55 and 65 FDC reticula and GCs in young mice (Fig. 11). Furthermore, the number of FDC-M1- and anti-CR1/2-positive FDC reticula were similar in young and old mice (Fig. 11). In marked contrast, the number of anti-FcγRII- and FDC-M2-positive FDC reticula was reduced by 70–80% in old mice and this correlated with a 70–80% reduction in PNA-positive GCs (Fig. 11).

Comparison of ITIM signaling in B cells in the presence of young and old FDC

Recent results suggest that FDCs can block ITIM signaling in A20 cells induced by co-cross-linking BCR and B cell FcγRII and that FDC FcγRII is critical to blocking this process (J.G.T., unpublished data). We reasoned that FDCs bind Ig-Fc and minimize co-cross-linking BCR to B cell FcγRII and subsequent activation of the ITIM. It followed, therefore, that the lack of FcγRII on old FDC would correlate with ITIM activation as indicated by SHIP phosphorylation. To test this, A20 cells were stimulated using anti-BCR, a well-known inducer of SHIP phosphorylation, as an analog for ICs (Fig. 12). In contrast with anti-BCR (a positive control), the $F(ab')_2$ of anti-BCR cannot engage B cell FcγRII and represents a negative control. As expected, young FDCs blocked SHIP phosphorylation while old FDCs did not and were similar to control FDCs that lacked FcγRII or with FcγRII blocked by specific Ab (Fig. 12).

Complement and IC-mediated FDC Ag stimulation

In a recent study, old FDCs functioned as well as young FDCs when the primary B cell signal was delivered by LPS and when FDCs were incubated with ICs and complement to provide old FDCs with adequate CD21L to engage the B cell coreceptor complex (27). However, BCR and FcγRII are not coligated and ITIM signaling does not occur when LPS is the primary stimulator, thus a deficit in FcγRII on old FDCs would not be a problem. This prompted us to reason that increasing the CD21L concentration on old FDCs would not restore immune responses when specific B cells were stimulated with ICs given that old FDCs lack normal levels of FcγRII. Memory B and T lymphocytes from young mice were incubated with ICs and complement to keep these elements equivalent and to reduce the study to a comparison of old vs young FDCs. As predicted, the old FDCs with additional CD21L failed to

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

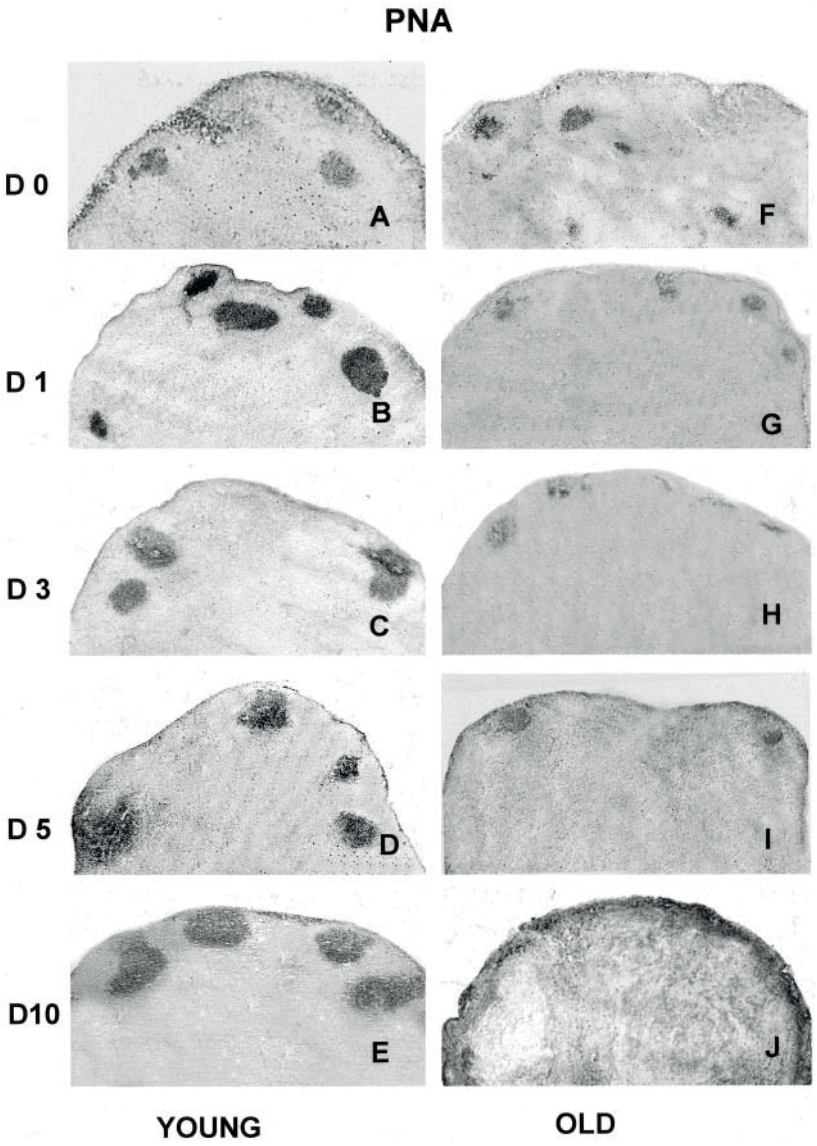


FIGURE 9. Representative light micrographs illustrating the kinetics of immunohistochemical labeling of PNA^+ GCs in the draining axillary lymph nodes of actively immunized young and old mice with FDC-M2. These are the same lymph nodes as those shown in the preceding figures. Note the clear difference in labeling of the GCs in young and old mice. The same relationships were apparent in brachial and popliteal lymph nodes. D, day. Magnification, ×120.

induce a normal response with young memory B and T lymphocytes (Fig. 13) and this result is consistent with the lack of FcγRII on old FDCs.

Old FDCs and FcγRIIB$^{-/-}$ B lymphocytes

Based on previous (27) and present observations, we reasoned that if a major problem with old FDCs relates to an inability to express normal levels of FcγRII and bind Ig-Fc, then old FDCs should be able to stimulate B cells lacking FcγRII quite normally. It is known that FDCs from FcγRIIB$^{-/-}$ mice fail to stimulate wild-type B cells where co-cross-linking of BCR and FcγRII can occur, but that they stimulate B cells in the FcγRIIB$^{-/-}$ mice normally (13). Accordingly, we tested old FDCs for their capacity to stimulate Ab production by FcγRIIB$^{-/-}$ lymphocytes in a system where ITIM signaling via BCR and B cell FcγRII cannot occur. In the absence of the IC-derived inhibitory B cell signaling, old FDCs were able to induce a much improved Ab response and when given ICs with complement to provide CD21L, the responses were comparable to those of young FDCs (Fig. 14).

Discussion

Humoral responses exhibiting high levels of high affinity Ab to T-dependent Ags require not only T and B cells but also FDCs (31–35). In the present study, we compared the expression of surface receptors (i.e., FcγRII, and CR1/2) on young and old FDCs that is critical for IC retention and is involved in FDC-B cell interactions (5–7, 10–17). The experiments were designed to study the kinetics of receptor expression during the GC reaction and provided the first comparative analysis of the kinetics of expression of FcγRII, CR1/2, and the epitopes for FDC-M1 and FDC-M2 during recall responses in young and old mice. The mAb FDC-M1 was used to monitor FDC presence (the FDC reticulum) and FDC-M2, which reacts with the C4 fragment of complement associated with the FDC-ICs (30), was used to monitor Ag trapping/retention by FDCs in the FDC reticulum. Our goal was to understand why old FDCs trap less IC, exhibit depressed Ag-specific and costimulatory signals, and support only low level Ab production (3, 18, 20, 27). Results revealed that both the average density of FDC-M1 labeling and the area of FDC reticulum labeled with FDC-M1 were similar in young and old mice. Thus, the data suggested that reduced IC trapping in old mice was not due to a decrease in the number of FDCs or to reticulum development. However, FcγRII labeling on old FDCs was dramatically reduced in the 3- to 10-day period of the GC reaction. Not only was the average density of FcγRII labeling on old FDCs diminished but FDC reticula number and sizes were dramatically reduced, indicating that only some

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

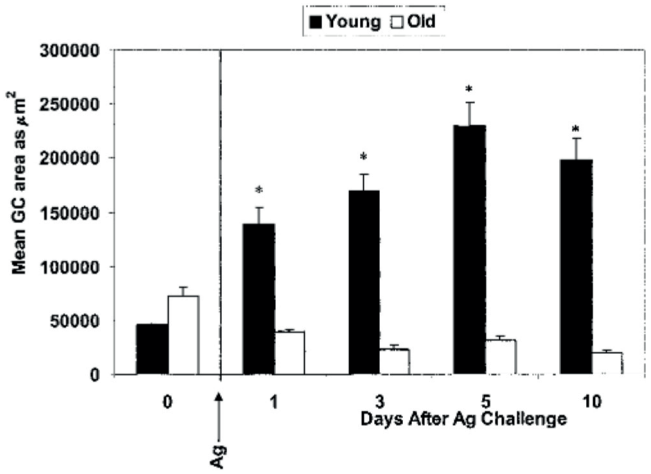


FIGURE 10. Size of the average PNA-positive GCs in the draining lymph nodes of young and old mice as assessed by labeling with PNA labeling. Young (■) and old (□) mice were actively immunized and challenged with OVA. These are the same lymph nodes as those shown in the preceding figures. The averages were calculated using data from three to six mice per day. Note that the GC size was significantly reduced in old mice compared with young mice and remained very small during the 3, 5, and 10 days of the GC response. The data represent the mean in square micrometers ± SEM and significant age-related differences are indicated by the asterisk (*, $p < 0.003$).

reticula have FDCs expressing FcγRII and not all of the FDCs in the positive reticula express substantial levels of FcγRII. This observation correlates with reduced IC trapping by old FDCs (18, 19) and this was confirmed with a reduced FDC-M2 labeling that correlated with the reduced FcγRII. Moreover, reduced PNA-positive GC numbers in old mice correlated well with FDC-M2 staining. This further supports our previous observation that the ratio of the FDC reticula determined by Ag trapping to GC numbers is 1:1 (18), emphasizing the dependence of GC development on Ag-bearing FDCs. Remarkably, even though the number of FDC-M1-positive reticula and the average size of FDC-M1-positive reticula was similar in young and old mice, it appears that many old reticula that lacked FcγRII failed to trap ICs and were unable to support GC formation. Moreover, these results are consistent with studies showing that FDCs treated with anti- FcγRII (2.4G2) or from FcγRII$^{-/-}$ mice support only low level Ab production with wild-type B cells (11, 13). Consequently, the present data suggest that FcγRII expression on FDCs is not only critical for mediation of IC retention but for regulation of the B cell recall response.

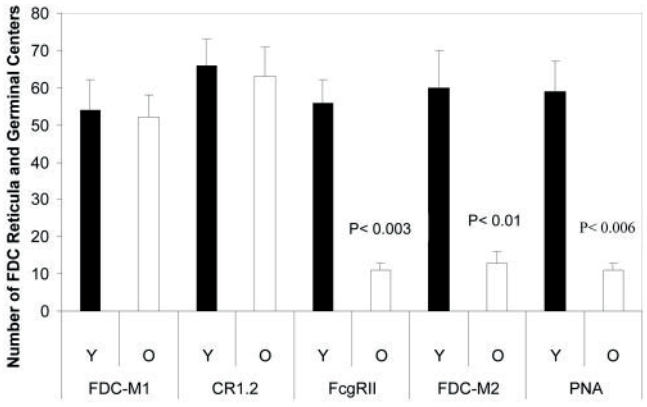


FIGURE 11. Correlation between the number of FDC reticula expressing FcγRII, IC trapping (indicated by FDC-M2), and a reduced number of PNA-positive GCs in old mice. Analysis of FDC reticula and GC number was done using a pool of draining lymph nodes (two axillaries, two brachial, and two popliteal). Young (■) and old (□) represent results from mice that were actively immunized and challenged with OVA in each of the front legs and hind feet. The data represent the mean number of FDC reticula positive for FDC-M1, anti-CR1/2, anti-FcγRII, or FDC-M2, or the mean number of GC positive for PNA in pooled draining lymph nodes ± SEM and significant age-related differences are indicated by the p value. Some GCs in old mice appeared to fragment and closely associated fragments in a single follicle were counted as a single GC. These data were obtained from mice taken at day 5 but the same relationship exists at days 3 and 10. Y, Young; O, old.

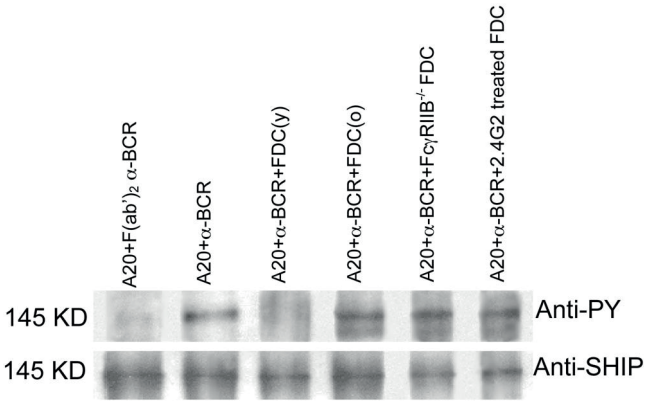


FIGURE 12. Old FDCs fail to inhibit SHIP phosphorylation in A20 cells stimulated with anti-BCR. A20 cells were cocultured with young and old FDCs for 30 min at 37°C to allow FDC-A20 cell interactions (for in vitro GCs to form) and then stimulated with anti-mouse BCR, a well-known inducer of SHIP phosphorylation. Cells were then lysed, the lysate was immunoprecipitated with anti-SHIP, resolved using SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and probed using anti-phosphotyrosine Ab. Note that incubation of A20 cells with young FDCs reduced ITIM signaling as indicated by reduced SHIP phosphorylation compared with A20 cells stimulated with anti-BCR. On the other hand, incubation of A20 cells with old FDCs, FcγRIIB$^{-/-}$ FDCs, or FDCs with FcγRII blocked with 2.4G2 failed to block SHIP phosphorylation in A20 cells stimulated with anti-BCR. This result is representative of three experiments of this type.

Given that old animals produce less specific Ab, it might be reasoned that the reduced Ab might yield less IC and altered FDC maturation as indicated by a lack of FcγRII. However, FDCs trap Ag-Ab complexes over a wide range of Ag:Ab ratios (36) and Ab levels of 2–300 μg are sufficient to trap ICs well in young mice (37), and these levels are achieved in aged mice (20). More significantly, when young and old animals are provided with identical amounts of specific Ab by passive transfer, ICs form in old animals normally and can be found in the afferent lymph and the subcapsular sinuses of lymph nodes as they are in the young. However, in young animals ICs are retained on FDCs and numerous GCs develop. In marked contrast, in old animals a much smaller amount of IC is retained on the FDC reticulum and GCs are reduced in number and are much smaller (18, 19). Similarly, when young and old mice are injected with young memory B and T cells, to be certain memory B and T cells are in equal number, the recall responses in aged mice that depend on old FDCs are abnormally low (20). Thus, the problem with FDC function in aged mice does not appear to simply be a problem with Ab and IC formation or the presence of memory cells.

FDC-FcγRII appears to be needed to trap optimal amounts of ICs and then plays a role organizing these ICs in a stimulatory format for B cells (11, 13). Direct interaction of ICs with B cells is known to lead to ITIM signaling and a lack of B cell responsiveness (38–40). Recent data suggest that FDCs can block the ITIM signaling in A20 cells apparently by minimizing interaction

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

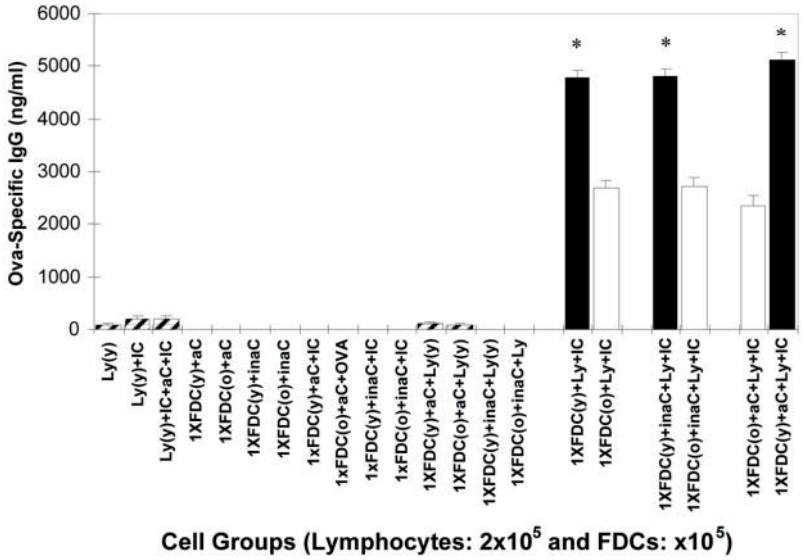


FIGURE 13. Incubation of old FDCs with ICs and complement from young mice did not restore stimulatory activity. Note that young FDCs (y) stimulate OVA-specific Ab production by memory lymphocytes (Ly) but old (o) FDCs could support only a lower anti-OVA response. Incubation of old FDCs with active C (aC) and IC did not restore the Ag-handling capacity of old FDCs and was not different from IC plus heat-inactivated complement (inaC). These data are typical of three experiments of this type and results are depicted as the mean SEM of total IgG produced ($p < 0.005$).

of Ig-Fc in ICs with A20 cell FcγRII and thus promoting B cell activation.[4] Activation of the ITIM in cells results in phosphorylation of SHIP (38, 41). SHIP is the main ligand for phosphorylated ITIM and that SHIP phosphorylation correlates with ITIM signaling (42–46). Based on these observations, we hypothesized that old FDCs lacking FcγRII would not block SHIP phosphorylation in cells stimulated by anti-BCR. The capacity of old FDCs, taken 3 days after Ag challenge, to block SHIP phosphorylation in A20 cells induced by anti-BCR was shown to be impaired (Fig. 12). The data suggest that Ag handling and costimulatory activity of old FDCs become defective and their capacity to prevent ITIM signaling deteriorates with aging. It appears that this is a consequence of reduced expression of FcγRII on old FDCs that fails to block the inhibitory effect of ICs by binding of Fc in the IC. This ultimately results in B cell inactivation and significantly depressed secondary Ab responses.

Recently, we reported that incubation of old FDCs with C and ICs repaired the age-related defect when the primary B cell signal was delivered by LPS and costimulatory signals were provide by aged FDC (27). In this model, the critical FDC costimulatory signal was delivered by CD21L and additional CD21L was provided by incubating the aged FDCs with ICs and complement. The additional CD21L dramatically improved the ability of old FDCs to augment Ab production by LPS-stimulated B cells (27). We sought to determine whether an increased level of CD21L would remedy the age-related deficit in handling specific Ag. Old FDCs were treated with OVA-anti-OVA and complement and then tested in a recall response using memory T and B cells from OVA-immune mice. However, the treatment of old FDCs with complement and IC did not repair the depressed Ag-handling capacity of old FDCs and anti-OVA production remained depressed (Fig. 13). We reason that the lack of FDC-FcγRII on aged FDCs cannot prevent coligation of B cell FcγRII and BCR (13) and lack of FcγRII on FDCs may also interfere with the ability of FDCs to arrange for the formation of iccosomes, which are the IC-coated small spherical structures on which Ag is delivered from FDCs to B cells for endocytosis and processing (19, 20, 31, 47). Thus, it is not surprising that while additional CD21L may augment LPS-stimulated B cells it does not restore normal Ag handling and the suppression

[4] Y. Aydar, J. Wu, J. Song, A. K. Szakal, and J. G. Tew. FcγRII expression on follicular dendritic cells and ITIM signaling in B cells. *Submitted for publication*.

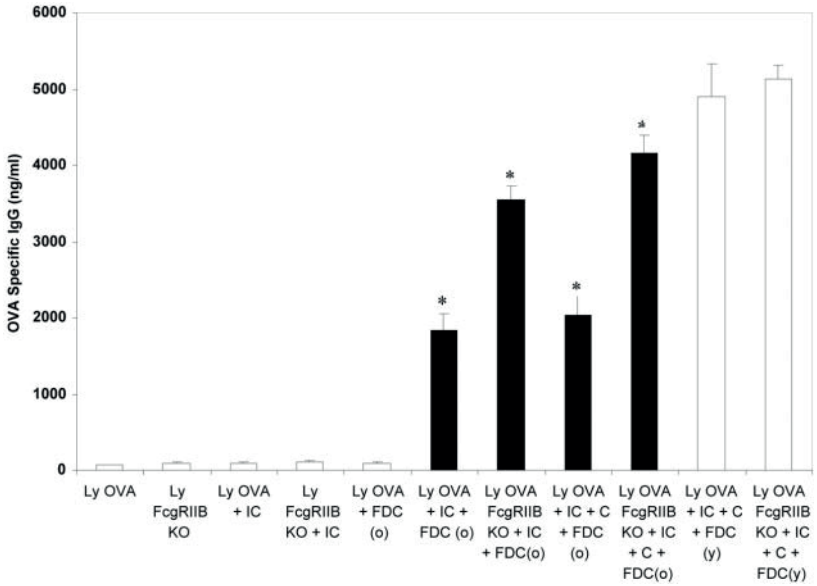


FIGURE 14. Old FDCs stimulated FcγRIIB$^{-/-}$ B cells to produce near normal levels of specific Ab. Wild-type old FDCs were cocultured with young wild-type OVA-specific lymphocytes (Ly) or with young OVA-specific FcγRIIB$^{-/-}$ lymphocytes in the presence of IC with or without complement. The depressed Ab response typical for old FDCs was not apparent with FcγRIIB$^{-/-}$ B lymphocytes because ITIM signaling induced by cross-linking of BCR and B cell FcγRII cannot occur. Addition of complement also improved the Ab response by providing more CD21L for costimulation. KO, Knockout.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

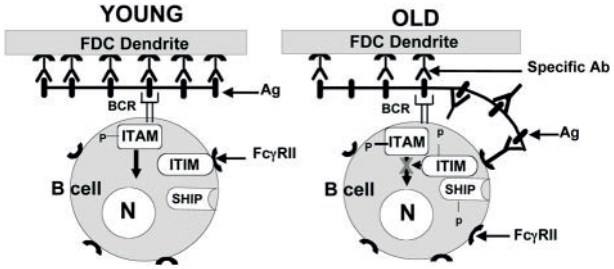


FIGURE 15. Important differences in the molecular interactions involved in signaling B cells with FDCs from young or old mice. Based on immunocytochemical data, there is an exceptionally higher density of FcγRII on young FDCs than on B cells. The FcγRII on young FDCs apparently engages essentially all Ig-Fc on the Ag-Ab complexes. Thus, very little Ig-Fc is left that would be able to bind to B cell FcγRII receptors and activate ITIM signaling. By contrast, old FDCs are deficient in FcγRII and do not engage all (or most) Ig-Fc on the ICs. This would allow B cell-BCR and FcγRII receptors to be cross-linked and ITIM activated. This ultimately results in B cell inactivation and depressed Ab production. N, Nucleus, ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif.

induced by ITIM signaling in specific B cells. However, when we used FcγRIIB$^{-/-}$ lymphocytes where ITIM signaling via BCR and B cell FcγRII cannot occur, old FDCs given ICs with complement were able to induce Ab responses that were comparable to those of young FDCs (Fig. 14). This experiment provides additional independent support for the concept that old FDCs lacking normal levels of FcγRII do not inhibit ITIM signaling and fail to stimulate wild-type B cells normally.

In conclusion, our data may be summarized in a simple working model illustrated in Fig. 14. Based on immunocytochemical data, FcγRII receptors on the surface of young FDCs are markedly higher than on the surface of B cells. We reason that the FcγRII on FDCs engage essentially all Ig-Fc in the Ag-Ab complexes. Thus, very little Ig-Fc is left that would be able to bind FcγRII on B cells and activate ITIM signaling by cross-linking with BCR (Fig. 15). FcγRII levels on old FDCs were low, particularly in the 3- to 10-day period after secondary immunization, and we reason that old FDCs would not engage all (or most) Ig-Fc on the ICs (Fig. 15). This would allow B cell BCR and FcγRII receptors to be cross-linked, ITIM signaling to be initiated, B cell maturation would then be inhibited, and consequently aged mice would lack the ability to mount a vigorous recall response.

References

1. Szakal, A. K., and M. G. Hanna, Jr. 1968. The ultrastructure of antigen localization and viruslike particles in mouse spleen germinal centers. *Exp. Mol. Pathol. 8:75*.
2. Nossal, G. J., A. Abbot, J. Mitchell, and Z. Lummus. 1968. Antigens in immunity. XV. Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles. *J. Exp. Med. 127:277*.
3. Tew, J. G., M. H. Kosco, G. F. Burton, and A. K. Szakal. 1990. Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev. 117:185*.
4. Mitchell, J., and A. Abbot. 1965. Ultrastructure of the antigen-retaining reticulum of lymph node follicles as shown by high-resolution autoradiography. *Nature 208:500*.
5. Tew, J. G., and T. E. Mandel. 1979. Prolonged antigen half-life in the lymphoid follicles of specifically immunized mice. *Immunology 37:69*.
6. Hanna, M. G., Jr., and A. K. Szakal. 1968. Localization of ^{125}I-labeled antigen in germinal centers of mouse spleen: histologic and ultrastructural autoradiographic studies of the secondary immune reaction. *J. Immunol. 101:949*.
7. Schriever, F., and L. M. Nadler. 1992. The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Adv. Immunol. 51:243*.
8. Schwarz, Y. X., M. Yang, D. Qin, J. Wu, W. D. Jarvis, S. Grant, G. F. Burton, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1999. Follicular dendritic cells protect malignant B cells from apoptosis induced by anti-Fas and antineoplastic agents. *J. Immunol. 163:6442*.
9. Qin, D., J. Wu, G. F. Burton, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1999. Follicular dendritic cells mediated maintenance of primary lymphocyte cultures for long-term analysis of a functional in vitro immune system. *J. Immunol. Methods 226:19*.
10. Wang, Y., G. Huang, J. Wang, H. Molina, D. D. Chaplin, and Y. X. Fu. 2000. Antigen persistence is required for somatic mutation and affinity maturation of immunoglobulin. *Eur. J. Immunol. 30:2226*.
11. Tew, J. G., J. Wu, M. Fakher, A. K. Szakal, and D. Qin. 2001. Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. *Trends Immunol. 22:361*.
12. Fakher, M., J. Wu, D. Qin, A. Szakal, and J. Tew. 2001. Follicular dendritic cell accessory activity crosses MHC and species barriers. *Eur. J. Immunol. 31:176*.
13. Qin, D., J. Wu, K. A. Vora, J. V. Ravetch, A. K. Szakal, T. Manser, and J. G. Tew. 2000. Fcγ receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. *J. Immunol. 164:6268*.
14. Yoshida, K., T. K. van den Berg, and C. D. Dijkstra. 1993. Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcRγII-mediated immune-complex trapping. *Immunology 80:34*.
15. Papamichail, M., C. Gutierrez, P. Embling, P. Johnson, E. J. Holborow, and M. B. Pepys. 1975. Complement dependence of localisation of aggregated IgG in germinal centres. *Scand. J. Immunol. 4:343*.
16. Yoshida, K., T. K. van den Berg, and C. D. Dijkstra. 1993. Two different mechanisms of immune-complex trapping in the mouse spleen during immune responses. *Adv. Exp. Med. Biol. 329:377*.
17. Klaus, G. G., and J. H. Humphrey. 1977. The generation of memory cells. I. The role of C3 in the generation of B memory cells. *Immunology 33:31*.
18. Szakal, A. K., J. K. Taylor, J. P. Smith, M. H. Kosco, G. F. Burton, and J. G. Tew. 1988. Morphometry and kinetics of antigen transport and developing antigen-retaining reticulum of follicular dendritic cells in lymph nodes of aging immune mice. *Aging Immunol. Infect. Dis. 1:7*.
19. Szakal, A. K., Z. F. Kapasi, A. Masuda, and J. G. Tew. 1992. Follicular dendritic cells in the alternative antigen transport pathway: microenvironment, cellular events, age and retrovirus related alterations. *Semin. Immunol. 4:257*.
20. Burton, G. F., M. H. Kosco, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1991. Iccosomes and the secondary antibody response. *Immunology 73:271*.
21. Kosco, M. H., G. F. Burton, Z. F. Kapasi, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1989. Antibody-forming cell induction during an early phase of germinal centre development and its delay with ageing. *Immunology 68:312*.
22. Qin, D., J. Wu, M. C. Carroll, G. F. Burton, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1998. Evidence for an important interaction between a complement-derived CD21 ligand on follicular dendritic cells and CD21 on B cells in the initiation of IgG responses. *J. Immunol. 161:4549*.
23. Maeda, K., G. F. Burton, D. A. Padgett, D. H. Conrad, T. F. Huff, A. Masuda, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1992. Murine follicular dendritic cells and low affinity Fc receptors for IgE (FcεRII). *J. Immunol. 148:2340*.
24. Rao, S. P., K. A. Vora, and T. Manser. 2002. Differential expression of the inhibitory IgG Fc receptor FcγIIB on germinal center cells: implications for selection of high-affinity B cells. *J. Immunol. 169:1859*.
25. Kosco, M. H., E. Pflugfelder, and D. Gray. 1992. Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro. *J. Immunol. 148:2331*.
26. Wu, J., D. Qin, G. F. Burton, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1996. Follicular dendritic cell-derived antigen and accessory activity in initiation of memory IgG responses in vitro. *J. Immunol. 157:3404*.
27. Aydar, Y., P. Balogh, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 2002. Age-related depression of FDCs accessory functions and CD21 ligand mediated repair of co-stimulation. 2002. *Eur. J. Immunol. 32:2817*.
28. Burton, G. F., D. H. Conrad, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1993. Follicular dendritic cells and B cell costimulation. *J. Immunol. 150:31*.
29. Helm, S. L., G. F. Burton, A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1995. Follicular dendritic cells and the maintenance of IgE responses. *Eur. J. Immunol. 25:2362*.
30. Taylor, P. R., M. C. Pickering, M. H. Kosco-Vilbois, M. J. Walport, M. Botto, S. Gordon, and L. Martinez-Pomares. 2002. The follicular dendritic cell restricted epitope, FDC-M2, is complement C4; localization of immune complexes in mouse tissues. *Eur. J. Immunol. 32:1888*.
31. Szakal, A. K., M. H. Kosco, and J. G. Tew. 1988. A novel in vivo follicular dendritic cell-dependent iccosome-mediated mechanism for delivery of antigen to antigen-processing cells. *J. Immunol. 140:341*.
32. Kosco, M. H., A. K. Szakal, and J. G. Tew. 1988. In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. *J. Immunol. 140:354*.
33. MacLennan, I. C., and D. Gray. 1986. Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. *Immunol. Rev. 91:61*.
34. Nieuwenhuis, P., F. G. Kroese, D. Opstelten, and H. G. Seijen. 1992. De novo germinal center formation. *Immunol. Rev. 126:77*.
35. Nieuwenhuis, P., and D. Opstelten. 1984. Functional anatomy of germinal centers. *Am. J. Anat. 170:421*.
36. Tew, J. G., T. E. Mandel, and G. A. Miller. 1979. Immune retention: immuno-

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

logical requirements for maintaining an easily degradable antigen in vivo. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 57:401*.
37. Phipps, R. P., G. F. Mitchell, T. E. Mandel, and J. G. Tew. 1980. Antibody isotypes mediating antigen retention in passively immunized mice. *Immunology 40:459*.
38. D'Ambrosio, D., D. C. Fong, and J. C. Cambier. 1996. The SHIP phosphatase becomes associated with FcγRIIB1 and is tyrosine phosphorylated during "negative" signaling. *Immunol. Lett. 54:77*.
39. Phillips N. E., and D. C. Parker. 1983. Fc-dependent inhibition of mouse B cell activation by whole anti-μ antibodies. *J. Immunol. 130:602*.
40. Bolland, S., R. N. Pearse, T. Kurosaki, and J. V. Ravetch. 1998. SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity 8:509*.
41. Chacko, G. W., S. Tridandapani, J. E. Damen, L. Liu, G. Krystal, and K. M. Coggeshall. 1996. Negative signaling in B lymphocytes induces tyrosine phosphorylation of the 145-kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP. *J. Immunol. 157:2234*.
42. Veillette, A., S. Latour, and D. Davidson. 2001. Negative regulation of immunoreceptor signaling *Annu. Rev. Immunol. 20:669.*
43. Pearse, R. N., T. Kawabe, S. Bolland, R. Guinamard, T. Kurosaki, and J. V. Ravetch. 1999. SHIP recruitment attenuates FcγRIIB-induced B cell apoptosis. *Immunity 10:753*.
44. Rohrschneider, L. R., J. F. Fuller, I. Wolf, Y. Liu, and D. M. Lucas. 2000. Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev. 14:505*.
45. Aman, M. J., S. F. Walk, M. E. March, H. P. Su, D. J. Carver, and K. S. Ravichandran. 2000. Essential role for the C-terminal noncatalytic region of SHIP in FcγRIIB1-mediated inhibitory signaling. *Mol. Cell Biol. 20:3576.*
46. March, M. E., and K. Ravichandran. 2002. Regulation of the immune response by SHIP. *Semin. Immunol. 14:37*.
47. Szakal, A. K., K. L. Holmes, and J. G. Tew. 1983. Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology. *J. Immunol. 131:1714*.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

dc_1678_19

seminars in **IMMUNOLOGY**, Vol. 14, 2002: pp. 267–274
doi:10.1016/S1044–5323(02)00059-3, available online at http://www.idealibrary.com on IDEAL®

Molecular interactions of FDCs with B cells in aging

Andras K. Szakal[a,*], *Yüksel Aydar*[a], *Peter Balogh*[a] *and John G. Tew*[b]

Follicular dendritic cells (FDCs), as accessory cells to B cells, promote germinal center (GC) development. Age-related defects in the role of FDCs are well documented in vivo. In old mice, FDCs bind fewer immune complexes (ICs) and produce few iccosomes for endocytosis by B cells, antigen processing, and presentation to T cells. We recently studied whether these defects are due to changes in the FDC microenvironment or to changes in FDCs and their surface molecules. In vitro evidence suggests that age-related defects in both B cell stimulation via the BCR and co-stimulation via CD21/CD21L are related to IC-trapping by FDCs in vivo—a defect which is repairable, at least, in vitro.

Key words: FDC / B cell / aging / FcγRII / CR1,2

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Introduction

Nine years ago in another article in *Seminars in Immunology*[1] we reviewed some of the age-related defects relating to follicular dendritic cells (FDCs) *in vivo*. These observations resulted from detailed kinetic studies that took into account the reduced antigen transport to lymphoid follicles, the incomplete development of the FDC-network, as visualized by antigen trapping, and the poor development of germinal centers (GCs). In the present account, we describe *in vitro* approaches[2] to the study of aging FDCs and relate the results to our current working model of FDC–B cell–T cell interactions.[3]

From the [a]*Department of Anatomy, Immunology Group, Virginia Commonwealth University, Medical College of Virginia Campus, P.O. Box 980709, Richmond, VA 23298-0709, USA and* [b]*Department of Microbiology and Immunology, Virginia Commonwealth University, Medical College of Virginia Campus, P.O. Box 980678, Richmond, VA 23298-0678, USA.*
[*]*Corresponding author. E-mail:* aszakal@hsc.vcu.edu
© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
1044–5323 / 02 / $– see front matter

The molecular model of FDC–B cell interaction

This molecular model and its supporting data were recently reviewed in detail in *Trends in Immunology*;[3] therefore, we will focus primarily on application of the model to aging rather than the experiments supporting its validity. The molecular interactions between FDCs and immune complexes (ICs), and FDCs and B cells, via the ICs and bound complement fragments of C3 (iC3b, C3dg, and C3d) that represent CD21 ligand (CD21L) are illustrated in Figure 1A. FDCs trap Ag–Ab complexes and provide intact Ag for interaction with BCRs on GC B cells and this Ag–BCR interaction provides a positive signal for B cell activation and differentiation. FDC–CD21L binds complement receptor 2 (CR2 or CD21) on the B cell via CD21 in the B cell co-receptor complex consisting of CD19/CD21/TAPA-1.[4] Engagement of CD21 in the B cell co-receptor complex by complement-derived FDC–CD21L delivers a critical co-signal (illustrated in Figure 1A). Co-ligation of BCR and CD21 (as in Figure 1A with a single molecule of Ag) facilitates association of the two receptors, and the cytoplasmic tail of CD19 is phosphorylated by a tyrosine kinase associated with the B cell receptor complex.[5] The curved arrow pointing from the BCR to CD21 in Figure 1A is intended to indicate this known interaction. This co-signal dramatically augments stimulation delivered by engagement of BCR by Ag; however, blockade of FDC–CD21L reduces the immune responses considerably (typically 10- to 1000-fold).[6]

Immunogens are almost instantaneously converted into ICs by Ab persisting in immune animals from prior immunization(s) and ICs form in primary responses as soon as the first Ab is produced. These ICs are trapped by FDCs and this leads to GC formation. ICs are poorly immunogenic *in vitro*, yet a minimal amount of Ag (converted into ICs *in vivo*) provokes potent recall responses. Our results indicate that FDCs render ICs highly immunogenic. In fact, in the presence of FDCs, the ICs are more immunogenic than free Ag.[3] A high density of FcγRIIB on FDCs bind

dc_1678_19

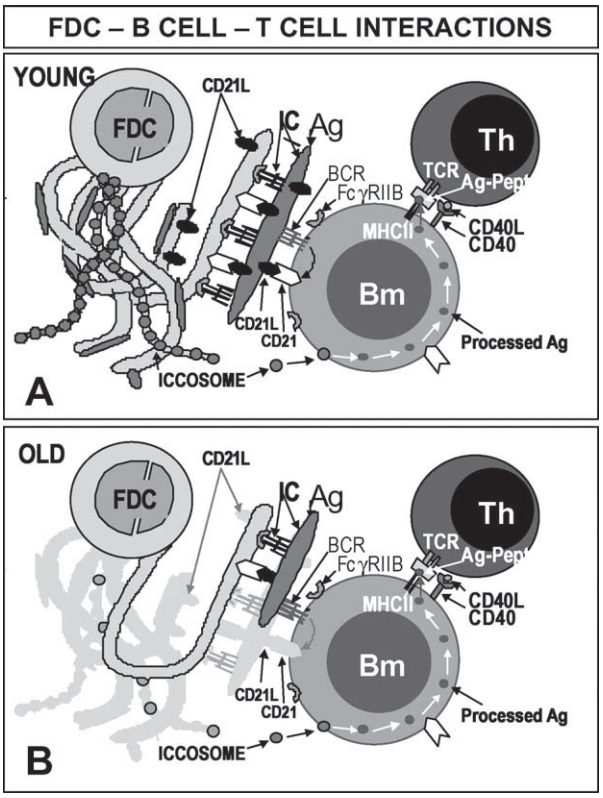


Figure 1. (A) and (B) A comparison of receptor ligand interactions in young and old mice (absence of events is indicated by gray 'ghosts'). The need for B and T cells interaction is well known. The important FDC–B cell events are: (1) (A) FDCs provide intact Ag to interact with BCR and provide a positive signal for B cell activation and differentiation. (B) In aged mice the Ag trapped is much less. (2) (A) FDCs provide a complement-derived CD21L for ligation with B cell CD21. This interaction with the CD21/CD19/TAPA-1 complex delivers a positive co-signal for activation and differentiation. (B) Hypothetically, in aged mice because of less trapped Ag, less CD21L is generated and co-stimulatory activity will be reduced. (3) (A) FcγRIIB on FDCs will bind Ig-Fc of Ag–Ab complexes. This preempts the inhibitory signal to ITIM in the B cell (note FcγRIIB on B cell is not engaged). (B) Hypothetically, in aged mice there are fewer FcγRIIB present on FDC dendrites so, some Ig-Fc on Ag may bind B cell FcγRIIB and inhibit B cells via the ITIM. (4) (A) FDCs provide iccosomes for endocytosis by B cells for use in processing and presentation of the iccosomal Ag to T cells. (B) In aged mice there are much fewer iccosomes produced by the FDCs—less presentation to T cells.

Ig-Fc in the IC and consequently the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) signal delivered via B cell FcγRIIB may be blocked. This inhibitory signal is initiated by Ag–Ab complexes cross-linking BCR and FcγRIIB on B cells. Note that BCR is not cross-linked with B cell FcγRIIB in the model because a high concentration of FcγRIIB on FDCs minimizes a negative signal to the B cell. In addition, FDCs provide IC-coated bodies (iccosomes), which B cells find highly palatable. The iccosome membrane is derived from FDC membranes that have Ag, CD21L, and Ig-Fc attached. Iccosomes bind tightly to B cells (as illustrated in Figure 1A) and are rapidly endocytosed.[7] We reason that binding of BCR and CD21 of the B cell to the iccosomal Ag–CD21L–Ig-Fc complex is critical to the endocytic process. The B cells process this FDC-derived Ag, present it, and obtain T cell help.[8] Thus, these FDC-facilitated ligand–receptor interactions help stimulate B cells and provide assistance beyond that provided by T cells.

The aging alternative antigen transport pathway

To update the reader on the current understanding of age-related changes occurring in the alternative antigen transport pathway, a comparison of the alternative antigen transport pathway in young and old mice illustrated by a two-paneled figure (Figure 2) shows the normal and age-altered transport pathways. This comparison will provide a background for the *in vitro* aging studies and lay the groundwork for our current hypotheses in the next section.

From our *in vivo* studies, we know that, in old C57BL/6 and BALB/c mice, the Ag transport is defective and remains incomplete.[9,10] There is a tendency of antigen transporting cells (ATCs) to accumulate in the subcapsular sinus of draining lymph nodes rather than entering the antigen transport pathway toward the follicles (see right panel of Figure 2). Those ATCs that did enter the antigen transport path remained developmentally incomplete instead of going through their metamorphosis to become FDCs. These ATCs developed fewer dendrites that trapped less Ag–Ab complexes while others became phagocytic and degraded the Ag. Other ATCs gave rise to defective FDCs and formed reduced, aberrant FDC-networks as seen by antigen localization. Iccosomes were not easily detectable. The normal 1:1 FDC-network to GC ratio—an expression of the Ag retention requirement for GC development—still existed in old mice;[11–13] however, due to Ag transport defects, significantly (~90%) fewer FDC-networks developed, and, in turn, proportionally fewer GCs were induced.[14] Since GCs are the sites of production of early Ab forming

dc_1678_19

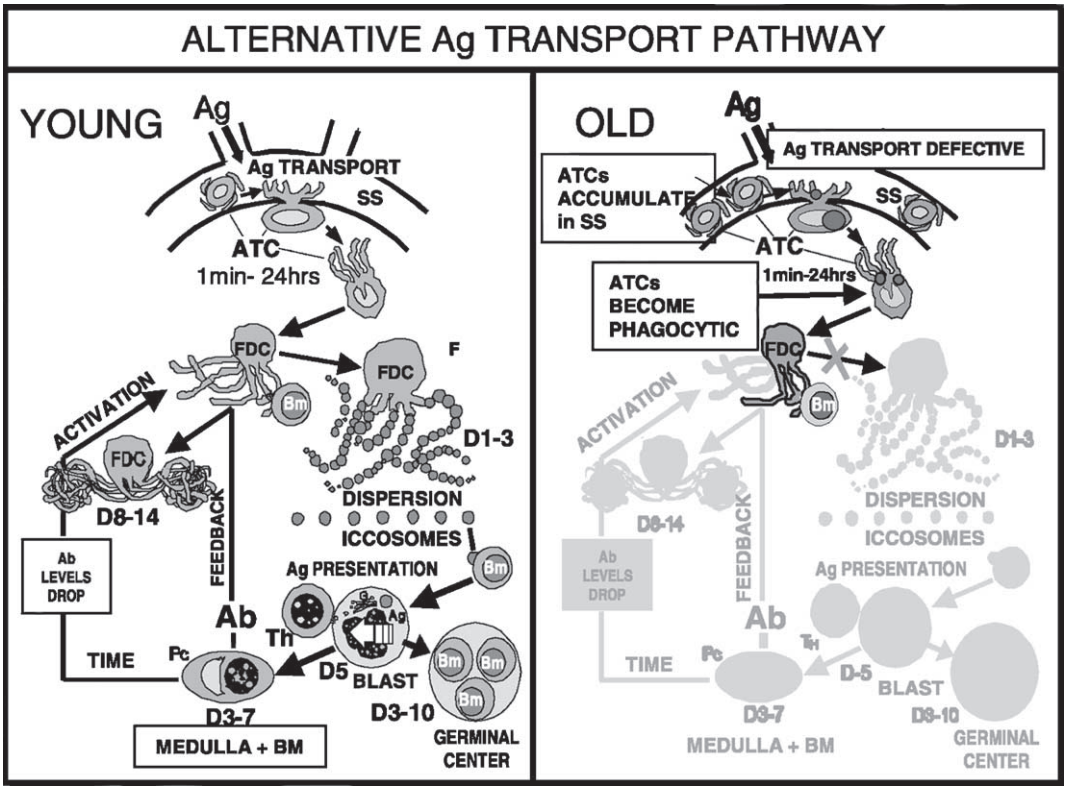


Figure 2. The alternative Ag transport pathway in young (left panel) and in old mice (right panel). Ag entering immune mice (top) immediately complexes with Ab. The ICs are transported on the surface of ATC from the subcapsular sinus (SS) of lymph nodes to follicles where ATCs become FDCs. FDC ICs bind and stimulate B memory (Bm) cells. FDCs mature, form iccosomes that are endocytosed by Bm cells. Bm cells process and present the iccosomal Ag to Th cells. In turn, more Bm cells form and a GC is formed. Other Bm cells form plasma cells (Pc) which produce Ab that feeds back and causes FDCs to hide the ICs in dendritic convolutions to end the cycle. With time Ab levels decline, FDC convolutions unfold, and the cycle restarts. In old mice, ATCs do not readily transport ICs, FDCs retain little ICs, and there is no cycle and no feedback. Little Ab (IgG) is produced and maintained.

cells[15,16] and, subsequently, B memory cells,[17–20] these results are consistent with the demonstrated age-related secondary Ab response depression.[21,22]

Recent immunohistochemical studies (unpublished) using the FDC reactive monoclonal Abs, FDC-M1 and FDC-M2, gave some insight into the reasons for the reduced trapping of ICs by old FDCs. FDC-M1 labeling showed surprisingly well-developed FDC-networks in Ag-stimulated 20-month-old mice. Further studies with FDC-M2, known to label C4 on FDCs (Kosco-Vilbois, personal communication), which is derived as the consequence of interaction between trapped ICs and complement, concurred with the results of Ag localization and stained fewer FDCs. These FDC-M2 studies showed a significantly reduced labeling of old FDC-networks in comparison to FDC-M1 labeling. In other words, while both Ag localization and FDC-M2 labeling of FDCs reflect the amount of ICs trapped on FDCs, FDC-M1 labels most FDCs in FDC-networks regardless of the trapped ICs. One may conclude from these studies that it is not the FDCs that are lost during aging but their capacity to trap antigens. The loss of this capacity would lead to the formation of fewer GC and reduced Ab production. We know that FcγRII (CD32), CR1 (CD35), and CR2 (CD21) are responsible mostly for the trapping of ICs on FDCs. The functionality of these receptors on aged FDCs is currently under investigation and it is clear that receptor levels on FDCs are subject to regulation. For example, in follicles with active GCs, the receptor levels on FDCs are high but in primary follicles the levels are lower and in the case of CD32 the receptor is difficult to detect.[23] Furthermore, preliminary data do suggest that regulation of these receptors on FDCs

dc_1678_19

in aged mice is aberrant and this may well relate to lack of normal trapping and retention of ICs on aged FDCs (unpublished).

Hypotheses on age-related changes in FDC–B cell stimulation and co-stimulation

Based on the results of *in vivo* studies, we postulated that old FDCs will not be able to stimulate B cells as well as young FDCs since: (1) old FDCs trap many folds less ICs than young FDCs, and (2) old FDCs have not been shown to produce many iccosomes for endocytosis of the antigen by B cells which would be used to present the processed antigen to T cells. According to the molecular model of FDC–B cell interaction, old FDCs with much reduced trapping of ICs would have a reduced chance of binding to B cells on account of activating and binding less complement; therefore, we reasoned that co-stimulation would also be affected and reduced. Thus, we will focus our attention on those experiments that supported these hypotheses.

Testing for antigen presentation to B cells by old FDCs

To isolate the old FDC effect, it was important to use young memory lymphocytes from immune animals. FDCs were isolated from naive mice which only had environmental ICs trapped on their dendrites. After adding young or old FDCs to the co-cultures, OVA–anti-OVA ICs were added to match the specificity of memory lymphocytes. These ICs were bound by the FDCs on their surfaces. The results of such a co-culture was evaluated by measuring specific antibody production and the results confirmed our hypothesis on stimulation of B cells and showed a 40–50% reduction in antibody production (see Figure 3). Stimulation in this sense meant stimulation through BCR and co-stimulation together. To isolate co-stimulation from 'stimulation' another approach was necessary.

Testing for co-stimulation of B cells by old FDCs

It was important to determine whether co-stimulation is also affected by aging and whether it contributes to the reduced accessory activity of old FDCs. In young animals, co-stimulation significantly increases

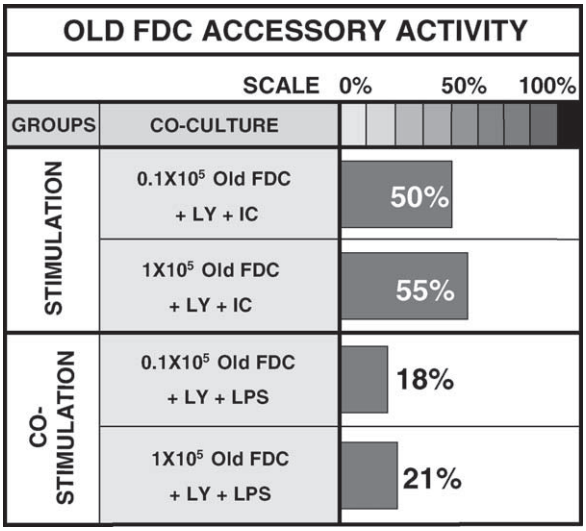


Figure 3. The accessory activity old FDCs is defective. Old FDCs were co-cultured with young lymphocytes stimulated by Ag or mitogen. In the stimulation panel, 2.5×10^5 young OVA specific memory T and B cells were stimulated by OVA–anti-OVA ICs (ICs) trapped by FDCs and the OVA-specific recall responses were measured 14 days later. Note that the recall responses of old FDCs were only about 50% of the normal responses obtained with young FDCs. For co-stimulation, which is an Ag-independent event, 2.5×10^5 naive lymphocytes in the co-cultures were stimulated with LPS. The results were obtained by determining the amount of total Ab produced in the culture supernatant using an ELISA and the data are plotted as percentage of young FDC control values. Note that Ab production was only about 20% of the normal obtained with young FDCs. Control cultures included lymphocytes alone, FDCs alone, lymphocytes plus FDCs with and without ICs or LPS, and none of the control responses exceeded 10% of the response in the experimental cultures with young FDCs, young lymphocytes, and Ag or LPS as the inducer.

the stimulatory effect of FDCs obtained via Ag presentation to the BCR. Since co-stimulation is an antigen-independent process, the cultures used polyclonally (LPS)-stimulated naive, young, lymphocytes, co-cultured with FDCs isolated from naive animals. These FDCs bear environmental Ags in the form of ICs on their surfaces. It was expected that these ICs would be associated with CD21L necessary for binding to CD21 on the B cell to effect co-stimulation. The results of these co-cultures (illustrated in Figure 3) showed that antibody production attributable to FDC co-stimulation was reduced over 80%. Consequently, FDC-mediated co-stimulation appeared significantly defective in old mice.

dc_1678_19

Assessing the role of old B and T cells

Both B and T cells have been shown to be affected by aging.[24–26] Therefore, it might be assumed that the depressed humoral immune response *in vivo* might results from a compilation of age-related defects of FDCs, B and T cells. However, it is known that GC B cells, which interact with FDCs in their microenvironment and also with T helper cells interspersed in the FDC-network, are derived from a distinct ($J11d^{lo}$) population of bone marrow precursors that are not affected by age.[27] Thus, aging B cells might function normally in the presence of young FDCs. Deficits in aged T cells may also be negligible as very few T helper cells are thought to be involved in the interaction with B cells in the follicular microenvironment. Furthermore, flowcytometric analyses showed that $CD4^+$ T cells were present essentially in equal numbers in young (59%) and old (55%) lymph nodes. To determine the contribution of deficits in aged B and T cells to the poor immune responses in the aged, we conducted experiments where we varied lymphocyte age (young versus old) but always used young FDCs. Since it was not possible to use old memory B cells, as memory B cells would be 'far and few between' in old animals due to an 80–90% reduction in the secondary antibody response, we used the same system as for the study of co-stimulation. Thus, young and old lymphocytes were stimulated with the B cell mitogen, LPS. The results were assessed by measuring total IgG production. The results showed (see Figure 4) that, regardless of whether young or old B cells were stimulated, the level of antibody production was the same. In other words, the age of B-lymphocytes did not modify the accessory activity of FDCs.

For assessing the effect of old T cells, we used antigen-primed mice to isolate 90% pure populations

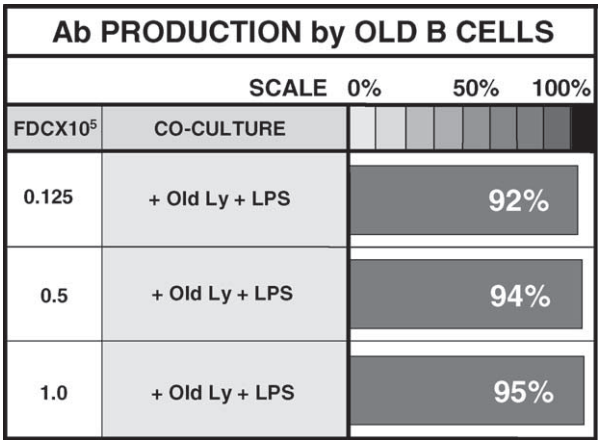


Figure 4. The Ab producing capacity of old B cells is comparable with young B cells in co-culture with young FDCs. In this study increasing numbers of young FDCs were co-cultured with 2.5×10^5 LPS-stimulated lymphocytes and the total Ab producing capacity (ng/ml) measured in the supernatant after 2 weeks of culture with an ELISA. The data is shown as the percentage of young B cell control. Note that the Ab producing capacity of old B cells were essentially unchanged by aging. Control cultures included young or old lymphocytes alone, young FDCs alone, young or old lymphocytes plus LPS, young FDCs plus LPS, and young, or old lymphocytes plus FDCs. Ab production in control cultures did not exceed 10% of Ab production in the experimental cultures (B cells, LPS, and young FDCs).

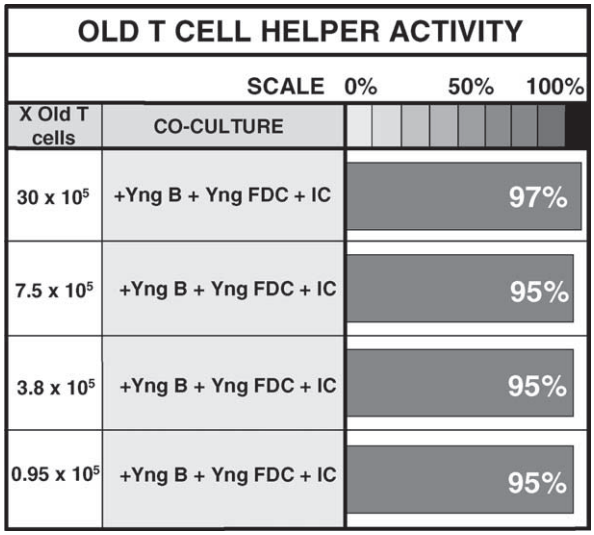


Figure 5. Old T cell helper activity is comparable with young (Yng) T cell helper activity as indicated by specific anti-OVA production in FDC–B cell–T cell co-cultures. T cells in decreasing numbers (see figure) were co-cultured with constant number of (2.5×10^5) young memory B cells and 1×10^5 young FDCs. T and B cells ratios were adjusted over a wide range and included ratios found in the draining lymph nodes of young and old mice. Anti-OVA production was induced by OVA–anti-OVA ICs and anti-OVA production was determined after 2 weeks of culture with an ELISA. Results are expressed as percentage of Ab produced by co-cultures with young T cells, young B cells, young FDCs, and OVA–anti-OVA ICs. The capacity of old T cells to provide T cells help for the anti-OVA response showed no apparent deficit *in vitro*. Negative controls included B and T cells alone, FDCs alone, B and T cells together with and without ICs, and B and T cells with FDCs. Ab production in none of the control cultures exceeded 10% of Ab production in the experimental cultures.

dc_1678_19

of T and B cells using negative selection in conjunction with B220- and Thy 1.2-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec). The T and B cells were mixed for the cultures according to B and T cell ratios determined for young and old lymph nodes by flowcytometric analysis. The numbers of T cells were subsequently reduced logarithmically in the cell population to 1/16th of the original ratio. The results showed (see Figure 5) no difference in antibody production between co-cultures using young or old T cells. Old T cells did not seem to modify the accessory activity of young FDCs, even at 1/16th of the concentration they are present in the old lymph node. Thus, FDCs appear to be responsible for the defect in the GC reaction and the anamnestic antibody response rather than B or T cells.

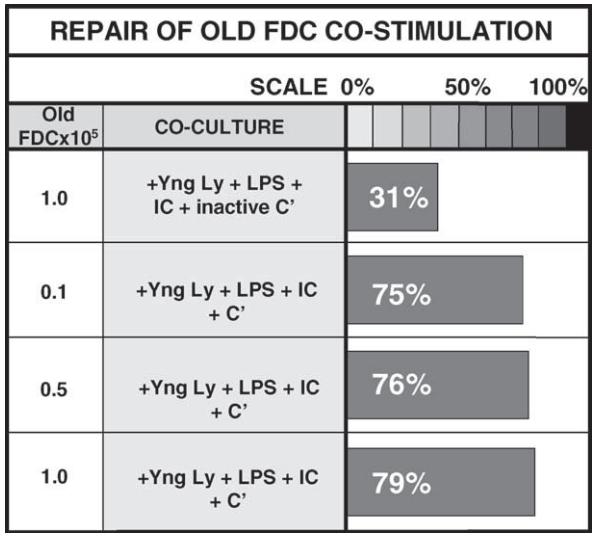


Figure 6. Repair of co-stimulatory activity in old FDCs by increasing the level of the complement (C′)-derived CD21L. Increasing numbers of young (Yng) and old FDCs with ICs derived from environmental antigens were co-cultured with young lymphocytes (Ly) plus LPS to stimulate the B cells. Old FDCs are known to trap few ICs and we reasoned that this would generate inadequate levels of CD21L needed to ligate B cell CD21 for co-stimulation and Ab production would be down. Note that the LPS induced Ab response of young Ly with old FDCs with heat-inactivated C′ was only 31% of normal. By pretreating FDCs with IC + C′, more CD21L may be generated to enhance Ab production. The results based on Ab production were expressed as percentage of Ab production in young FDC containing cultures with ICs, C′, and young Ly. The results show a nearly complete recovery of the co-stimulatory capacity of old FDCs over a dose range of FDCs. Negative control cultures produced ≤5% of the Ab of experimental cultures.

Repair of co-stimulation: a complement or antigen-loading defect?

Based on the molecular model of FDC–B cell interaction, we reasoned that the cause of the reduction in co-stimulation in old individuals might be the low availability of FDC IC-associated CD21L for binding to the B cell co-receptor, CD21. Because we knew from the results of *in vivo* studies that FDCs in old mice trap very few ICs, we postulated that CD21L availability would be reduced. To try to remedy this putative situation, we set up co-cultures with young and old FDCs and LPS-stimulated lymphocytes (B cells) in the same way as for the study of co-stimulation, except that we added ICs and active or inactivated complement. The reason for adding ICs and complement was that the new ICs would bind to the FDCs, activate the complement cascade, and bind more CD21L. These ligands were then expected to bind the FDCs to the B cells for co-stimulation. The results (see Figure 6) showed that co-cultures supplemented with ICs and active complement produced nearly as much antibody as co-cultures with young FDCs. In essence, our treatment of FDCs with ICs and complement increased FDC–CD21L and repaired the age-related defect in co-stimulation.

Summary and discussion

It is well known that with aging the antibody responses to recall antigens diminish.[22,28] This is closely related to the paucity of GCs in aged individuals.[14] GC development, the site of memory B cells, and initial plasma cell differentiation in the secondary Ab response, depend on FDC-networks and the FDC trapped and retained Ag.[13,14] Consequently, FDCs are pivotal to the initiation and maintenance of anamnestic Ab responses. FDCs were shown to develop from bone marrow precursors[29,30] and FDC precursors in the bone marrow of SCID mice could be used to reconstitute GC numbers (unpublished) when transferred to old mouse recipients. This ability of SCID bone marrow was not due to any B or T cell effects as SCID bone marrow does not contain functional B or T cells. In contrast with SCID mouse results, cell transfer studies also showed that old bone marrow could not restore GC numbers in the irradiated recipients (unpublished) further supporting a deficit or defect in bone marrow precursors. The GC deficit is unlikely to be due to defective B or T cells as we have shown that old B and T cells retained their capacity to support the anamnestic Ab response.

dc_1678_19

These data suggest that an age-related problem is with FDC function and suggest that age-related defects in FDC development exist at the precursor level in the bone marrow.

The next documented level of defect in FDC development is at the level of the ATCs.[31] ATCs are a group of veiled, dendritic cells that have a tendency to accumulate in the subcapsular sinus in old mice.[9,10] Only some of these cells appear to transport small amounts of Ag–Ab complexes to the follicles. Other ATCs appear to lack the capacity to transport Ag on their surfaces and thus, join the FDC-network without any trapped Ag. This lack of ability to trap Ag may account for the poorly developed appearance of FDC-networks in old mice as viewed by antigen localization. Therefore, many FDCs in the FDC-network of old mice appear to lack detectable Ag–Ab complexes. This lack of Ag may be the reason for the critically reduced number of iccosomes that form and lead then to the 90% reduction in the number of GCs with aging.[13]

Our *in vitro* studies reviewed here[2] show that FDC accessory activity, both the Ag-dependent stimulation of B cells and their Ag-independent co-stimulation, are seriously affected via a CD21L deficit, which is apparently inherent in the age-related reduction in the capacity of FDCs to trap and retain sufficient amounts of ICs. Work with aged T and B cells suggests that FDCs represent the 'bottle neck' in aged animals in the GC reaction and the anamnestic antibody response rather than B or T cells. This work directs the focus of future work on solving the problem of the age-related reduction in antigen trapping. At this time, it appears that the answer may lie with the antigen transport mechanism, which we have shown in the past to be seriously affected by aging and, as indicated by preliminary data, also with an age-related reduction in FcγRII and CR1,2 expressions. To avoid what seems to be a reason for the age-related reduction in co-stimulation, i.e. the reduced binding of CD21L on FDC ICs, methods may have to be developed to prevent the down-regulation or loss of FcγRII, and CR1,2, two important receptors responsible for IC binding to the FDC. These losses in key receptors are reminiscent of the state of FDCs upon the disruption of the LTα,β/TNF system in mice[32] that is known to regulate FDC development and maintenance.[33] The possibility exists that aging affects the LTα,β/TNF system which results in an improper development of FDCs or that there is an initial loss of LTβ receptors on FDCs and maintenance fails. We are currently studying these possibilities.

Acknowledgements

A significant part of this work was supported by the National Institute of Health Research Grant AG17063.

References

1. Szakal AK, Kapasi ZF, Masuda A, Tew JG (1992) Follicular dendritic cells in the alternative antigen transport pathway: microenvironment, cellular events, age, and retrovirus related alterations. Semin Immunol 4:257–265
2. Aydar Y, Balogh P, Tew JG, Szakal AK (2001) Age-related changes in follicular dendritic cell accessory activity. EJ Immunol (in press)
3. Tew JG, Wu J, Fakher M, Szakal AK, Qin D (2001) Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T cell help. Trends Immunol 22:361–367
4. Feron DT, Carter RH (1995) The CD19-CR2-TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. Annu Rev Immunol 13:127–149
5. Carter RH *et al* (1997) Membrane IgM-induced tyrosine phosphorylation of CD19 requires a CD19 domain that mediates association with components of the B cell antigen receptor complex. J Immunol 158:3062–3069
6. Qin D, Wu J, Caroll MJ *et al* (1998) Evidence for an important interaction between a complement-derived CD21 ligand on follicular dendritic cells and CD21 on B cells in the initiation of IgG responses. J Immunol 161:4549–4554
7. Szakal AK, Kosco MH, Tew JG (1989) Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: structure function relationships. Annu Rev Immunol 7:91–109
8. Kosco MH, Szakal AK, Tew JG (1988) *In vivo* obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells *in vitro*. J Immunol 140:354–360
9. Szakal AK, Taylor JK, Smith JP, Kosco MH, Burton GF, Tew JG (1988) Morphometry and kinetics of antigen transport and developing antigen retaining reticulum of follicular dendritic cells in lymph nodes of aging immune mice. Aging Immunol Infect Dis 1:7–22
10. Holmes KL, Schnizlein CT, Perkins EH, Tew JG (1984) The effect of age on antigen retention in lymphoid follicles and in collagenous tissue of mice. Mech Aging Dev 25:243–255
11. White RG, French VI, Stark JM (1970) A study of the localization of a protein antigen in the chicken spleen and its relation to the formation of germinal centers. J Med Microbiol 3:65–83
12. Thorbecke GL, Romano TJ, Lerman SP (1974) Regulatory mechanisms in proliferation and differentiation of lymphoid tissue, with particular reference to germinal center development. in Progress in Immunology (Brent L, Holbrow J, eds) pp. 25–43. North-Holland Publishing Co., Amsterdam
13. Thorbecke JG, Lerman SP (1976) Germinal centers and their role in immune responses, in The Reticuloendothelial System in Health and Disease: Functions and Characteristics (Reichard SM, Escobar MR Friedman H, eds) pp. 83–100. Plenum Press, New York
14. Szakal AK, Taylor JK, Smith JP, Kosco MH, Burton GF, Tew JG (1990) Kinetics of germinal center development in lymph nodes of young and aging immune mice. Anat Rec 227:475–485
15. Kosco MH, Burton GF, Kapasi ZF, Szakal AK, Tew JG (1989) Antibody-forming cell induction during an early phase of

dc_1678_19

germinal centre development and its delay with ageing. Immunology 68:312–318

16. Szakal AK, Kosco MH, Burton GF, Tew JG (1988) Germinal center B-cells in the induction and maintenance of the secondary antibody response, in Progress in Leukocyte Biology, vol. 7, Antigen Presenting Cells: Diversity, Differentiation, and Regulation (Schook LB, Tew JG, eds) pp. 281–290. Alan R Liss Inc, New York
17. Thorbecke GL, Romano TJ, Lerman SP (1974) Regulatory mechanisms in proliferation and differentiation of lymphoid tissue, with particular reference to germinal center development, in Progress in Immunology (Brent L, Holbrow J, eds) p. 25–34. North-Holland Publishing Co, Amsterdam
18. Coico RF, Bhogal BS, Thorbecke GJ (1983) Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. J Immunol 131:2254–2257
19. Klaus GGB, Kunkl A (1981) The role of germinal centers in the generation of immunological memory, in Microenvironments in Haemmopoietic and Lymphoid Differentiation, CIBA Foundation Symposium 1984, pp. 265–280. Pitman Medical, London
20. Klaus GG, Humphrey JH, Kunkl A, Dongworth DW (1980) The follicular dendritic cell: its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. Immunol Rev 53:3–28
21. Burton GF, Kosco MH, Szakal AK, Tew JG (1991) Iccosomes and the secondary antibody response. Immunology 73:271–276
22. Legge JS, Austin CM (1968) Antigen localization and the immune response as a function of age. Aus J Exp Biol Med Sci 46:361–365
23. Qin D, Wu J, Vora KA, Ravetch JV, Szakal AK, Manser T, Tew JG (2000) Fcγ receptor IIB on follicular dendritic cells regulated the B cell recall response. J Immunol 164:6268–6275
24. Ghia P, Melchers F, Rolink AG (2000) Age-dependent changes in B lymphocyte development in man and mouse. Exp Gerontol 35:159–165
25. Globerson AG, Effros RB (2000) Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. Immunol Today 21(10):515–521
26. Klinman NR, Thorbecke GJ (1995) Aging associated changes in the generation and development of B cell memory. Int Rev Immunol 12:5–12
27. Linton P-J (1993) The status of memory B cells in aged mice. Aging Immunol Infect Dis 4:35–46
28. Burton GF, Kosco MH, Szakal AK, Tew JG (1991) Iccosomes and the secondary Ab response. Immunology 73:271–276
29. Haley ST, Tew JG, Szakal AK (1995) The monoclonal antibody, FDC-M1, recognizes apparent precursors in the blood and bone marrow. Adv Exp Med Biol 378:289–291
30. Kapasi ZF, Qin D, Kerr WG, Kosco-Vilbois MH, Shultz LD, Tew JG, Szakal AK (1998) Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues. J Immunol 160:1078–1084
31. Szakal AK, Holmes KL, Tew JA (1983) Transport of ICs from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology. J Immunol 131:1714–1727
32. Mackay F, Browning JL (1998) Turning off follicular dendritic cells. Nature 395:26–27
33. Endres R, Alimzhanov MB, Plitz T, Futterer A, Kosco-Vilbois MH, Nedospasov SA, Rajewsky K, Pfeffer K (1999) Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin β receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxiB and tumor necrosis factor by B cells. J Exp Med 189:159–167

dc_1678_19

ELSEVIER

Ageing Research Reviews
3 (2004) 15–29

ageing
research
reviews

www.elsevier.com/locate/arr

Follicular dendritic cells in aging, a "bottle-neck" in the humoral immune response

Yüksel Aydar[a], Péter Balogh[a], John G. Tew[b], Andras K. Szakal[a,*]

[a] *Department of Anatomy and Neurobiology, and The Immunology Group, Virginia Commonwealth University, Medical College of Virginia Campus, 1101 East Marshall Street, Richmond, VA 23298, USA*
[b] *Department of Microbiology and Immunology, and The Immunology Group, Virginia Commonwealth University, Medical College of Virginia, Richmond, VA, USA*

Received 21 July 2003; accepted 4 August 2003

Abstract

Senescence leads to the appearance of atrophic follicular dendritic cells (FDCs) that trap and retain little immune complexes (IC), generate few memory B cells, and induce a reduced number of germinal centers (GC). Deficiencies in antibody responses to T cell dependent exogenous antigens such as pneumonia and influenza vaccines may reflect intrinsic FDC defects or altered FDC–B cell interactions. We recently studied antigen handling capacity and co-stimulatory activity of old FDCs and determined age-related changes in the expression or function of FcγRII or CR1&2 on FDCs. Here, we present an overview of FDC function in recall responses with known deficiencies in FDCs and GC development. Then, we review our recent work on aged FDCs and discuss age-related changes in molecular interactions between FDCs and B cells. We also discuss the causes underlying the impaired humoral immune response with respect to age-related molecular changes in FDC and B cell interactions. In vitro evidence suggests that FcγRII on aged FDCs is regulated abnormally and this in turn might cause the development of a defective FDC-network (reticulum) that retains few ICs, promotes ITIM signaling, prevents B cell proliferation and GC formation, and antibody production.
© 2003 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Follicular dendritic cells; Fc receptors; Immune complex; Humoral immune response; B lymphocytes; Germinal centers

1. Immunosenescence and infection

Immunosenescence is thought to be an important factor leading to increased susceptibility to infections (Yoshikawa, 2000; Rajagopalan, 2001; Callard et al., 1977; Powers and Belshe,

* Corresponding author. Tel.: +1-804-828-4518; fax: +1-804-828-9477.
E-mail address: aszakal@hsc.vcu.edu (A.K. Szakal).

1568-1637/$ – see front matter © 2003 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.arr.2003.08.002

dc_1678_19

1993). In comparison with younger populations, infectious diseases in the elderly are not only more frequent and severe, but they are also more difficult to treat. This is certainly true for diseases such as pneumonia, influenza, and complications of bacteraemia (Yoshikawa, 2000; Murasko et al., 2002; Saurwein-Teissl et al., 2002). For example, community-acquired pneumonia is three-fold and urinary-tract infection is 20-fold more prevalent in elderly than in younger adults (Yoshikawa, 2000; Fein, 1999; Marrie, 2000; Nicolle, 2002).

The number of studies of immunosenescence is large but, unfortunately, the results are often contradictory. However, there is no doubt that a decreased immune function in the elderly does exist. In this article we address age-related molecular changes related to interactions between follicular dendritic cells (FDCs) and B cells. First, an overview of FDC function in recall responses will be presented including known deficiencies in FDCs and germinal center (GC) development. We will then review recent studies on aged FDCs and finally we will discuss the causes underlying the impaired humoral immune response with respect to age-related molecular changes in FDCs and B cell interactions.

1.1. Antigen trapping and antigen transport

Age-related alterations of the immune system affect both antibody and cell-mediated immune responses. Vaccination becomes less effective, and deficiencies in antibody responses to exogenous antigens, such as pneumonia and influenza vaccines, have been described (Yoshikawa, 2000; Murasko et al., 2002; Saurwein-Teissl et al., 2002). The lack of adequate humoral responses may reflect intrinsic FDC defects or altered FDC–B cell interactions. These defects include altered activity in the "alternative antigen transport pathway" such as defective antigen transporting cells (ATCs) and FDCs. Aged FDCs produce few or no iccosomes (Szakal et al., 1988a) and induce fewer and smaller GCs (Szakal et al., 1988b).

The "*alternative pathway*" for handling antigens represents an alternative to the classical pathway involving antigen uptake and processing by macrophages and dendritic cells. In this pathway picogram quantities of antigen in an environment rich in specific antibody is used efficiently and leads to antigen processing and presentation by GC B cells. Antigen transport along this pathway results in the GC reaction where B cells proliferate and somatic hypermutation takes place leading to high affinity antibody production and the generation of B memory cells (Szakal et al., 1989; Tew et al., 1989). The alternative pathway starts by the trapping of IC in the lymphatics and transport of the antigen to lymph node follicles by antigen transporting cells (ATCs) (Tew et al., 1989; Szakal et al., 1983, 1992). The ATCs are non-phagocytic cells, that transport antigen on their surfaces as ICs to the site of the developing FDC-reticulum in the follicles (Szakal et al., 1983). ATCs appear veiled as they begin their journey to the follicles from the subcapsular sinuses of the lymph nodes. Along their path to the follicle, however, they develop dendrites and become indistinguishable from FDCs (Szakal et al., 1989; Tew et al., 1989). Antigen is retained in the form of ICs on FDCs via FcR (Schriever and Nadler, 1992; Yoshida et al., 1993) CR1 and CR2 on the surfaces of FDC-dendrites (Papamichail et al., 1975; Pepys, 1974). In turn, FDCs develop immune complex coated bodies (ICCOSOMES) (Szakal et al., 1988a), which deliver the antigen to B cells for endocytosis, antigen processing, and presentation to T helper cells (Szakal et al., 1988a,b, 1989; Kosco et al., 1988). Senescence leads to a paucity in GC

dc_1678_19

numbers (Tew et al., 1980; Coico et al., 1983) and atrophic FDCs (Szakal et al., 1988a,b) that trap and retain little antigen, generate few iccosomes, and induce a reduced number of GCs and memory B cells (Szakal et al., 1988a,b, 1992).

Antigen transport via the alternative pathway leads to the formation of the antigen retaining FDC-reticulum where the antigen, FDCs, specific B cells, and T helper cells needed for GC development are brought together in a special microenvironment of FDCs (Szakal et al., 1990). Studies using old C57BL/6 and BALB/c mice revealed that antigen transport is incomplete and that only a small fraction of antigen transport sites develop (Szakal et al., 1988a,b; Holmes et al., 1984). The deficit in antigen transport corresponds to a similar deficit in the number of FDC-retaining reticula by Day 1–3 after antigen challenge (Szakal et al., 1988a,b). Many old ATCs failed to develop dendrites and some old FDCs were ultrastructurally atrophic, retained little antigen, and produced no iccosomes. Nevertheless, the normal 1:1 FDC-reticulum to GC ratio—an expression of the antigen retention requirement for GC development—still exists in old mice (Szakal et al., 1988a,b, 1992; White et al., 1970); however, due to antigen transport defects, significantly (∼90%) fewer FDC-reticula developed, and, in turn, proportionally fewer GCs were induced (Szakal et al., 1990). Since GCs are the sites where early antibody forming cells (Tew et al., 1980, 1989; Szakal et al., 1983; Kosco et al., 1989) and, subsequently, memory B cells develop, these results support the hypothesis that a reduced capacity for antigen transport is responsible, at least in part, for the depressed secondary humoral immune response in old mice (Szakal et al., 1988a,b, 1990).

1.2. FDCs, the antigen retaining reticulum (ARR), and GCs

The GC reaction is initiated by rapid proliferation of antigen-stimulated B cells in association with FDCs and T cells (Szakal and Tew, 1992; Tew et al., 1990; Grouard et al., 1996). A major feature of FDCs is their ability to retain immune complexes on their surface for long periods of time, as long as months to years (Tew and Mandel, 1979). The dendrites of FDCs intertwine to form a three-dimensional network called the antigen-retaining or FDC-reticulum. Complement and Fc receptors (CRs) provide the main mechanisms for IC trapping on FDCs. Both mechanisms for antigen retention by FDCs require that antigen be complexed with antibody. Several significant functions have been postulated for the ICs that deposit on FDCs. It has been proposed that the initial localization of ICs on FDCs initiates the GC response and provides the antigen to which GC B cells respond. ICs on FDCs may also provide the stimulus that rescues high affinity B cells in GCs from apoptosis, thus leading to the formation of memory B cells. The initiation of proliferative activity leading to somatic mutation, which occurs in GCs, may also be dependent on FDC trapped antigen. Thus, FDC-ICs are thought to drive the initiation and normal progression of GC events and memory B cell development (Szakal et al., 1989, 1990; Tew et al., 1989).

Recent studies demonstrated that FDCs provide antigen-specific and co-stimulatory signals that are crucial for inducing and maintaining memory antibody responses (Schnizlein et al., 1984; Tew et al., 1995). Antigen-specific signals are generated via the interaction of the FDC-antigen with B cell BCR. Co-stimulatory signals appear to occur via C3 fragments on the FDC (C3 fragments: iC3b, C3dg, & C3d, or CR2L) engaging CR2 on the B cell (Burton et al., 1993). An optimal anamnestic antibody response requires both antigen-BCR

dc_1678_19

stimulation and co-stimulation via the B cell co-receptor complex (CD21, CD19 & CD81), resulting in a much greater response (Qin et al., 1998). B lymphocytes using either surface immunoglobulin dependent (anti-delta-dextran) or independent (LPS) stimulation in the presence of FDCs, led to a 2–3-fold augmentation of thymidine incorporation that occurred in a dose–responsive manner (Burton et al., 1993). FDCs cultured with B cells in the absence of a primary signal (mitogen) resulted in no significant augmentation of proliferation, indicating that the FDC signal was co-stimulatory in nature. FDCs also provide other soluble and contact-dependent signals that promote GC B cell viability, proliferation, and chemotactic responsiveness (Burton et al., 1993; Qin et al., 1998; Freedman et al., 1990, 1992).

FDC-derived antigen-specific signals and co-stimulatory signals that help generate FDC-derived antigen-dependent or independent signals have not been studied in aged mice. Optimal GC formation requires both antigen-BCR stimulation and co-stimulation. Since both GC numbers and GC size (which reflect B cell proliferation) are ultimately reduced with age, we reason that a reduction in FDC–B cell interactions and FDC accessory functions, such as antigen handling and receptor co-receptor stimulation leads to impaired de novo GC development and depressed antibody production in aging. This depression in turn may result from age-related defects in the expression of FDC cell surface receptors (i.e., CR and FcR). Therefore, we studied the expression of surface molecules using mAbs FDC-M1, FDC-M2, anti-CR1&2, and anti-FcγRII on FDCs during the GC reaction in old mice. Characterization of the effects of aging on FDCs and the ability of these cells to present antigen and to interact with B cells in the development of new GCs might have significant implications for future treatments of immunodeficiency—whether resulting from age or disease.

2. Old FDCs fail to stimulate antibody production by lymphocytes

The distinctive characteristics of FDC-antigen–B cell–T cell interaction responsible for production of humoral immune response are summarized in Table 1. Many factors have been previously identified as potential sources of age related decline in humoral immunity, particularly in lymphocytes. One difficulty in many of the studies examining the aging of lymphocytes and lymphocytes in the aged is the inability to differentiate between effects due to B cells or T cells versus intrinsic FDC defects. Studies using normal aged animals are limited in that apparent B-cell deficiency (decreased antibody production/low affinity, etc.) may be due to decreased support from other cell types, particularly aged FDCs. In order to examine possible intrinsic defects of aged FDCs, we have generated a physiologically relevant in vitro microenvironment in which naïve or memory B + T cells were co-cultured with FDCs in the presence of an antigen, LPS or OVA.

Optimal humoral immune responses exhibiting high levels of high affinity antibody to T dependent antigens require not only T and B cells but also FDCs (Szakal et al., 1988a,b; Kosco et al., 1988; Berek and Ziegner, 1993; MacLennan and Gray, 1986). In order to study the effect of aging on FDC–lymphocyte interaction in vitro and isolate FDC functions from their in vivo environment, we studied the antigen handling capacity of old FDCs in co-cultures of OVA specific memory B + T lymphocytes stimulated with IC (OVA–anti-OVA). Since in vivo antigen localization studies suggested a reduction in the number of old FDCs (Szakal et al., 1990, 1992), we initially determined the percentage of

dc_1678_19

Table 1
Summary of evidence supporting the concept that FDCs are a "bottle-neck" hampering optimal humoral immune responses in the aged

Feature	Associated phenomenon
(1) IgG response in old vs. Young mice	Cultures of T cells, B cells and FDCs from old mice fail to produce IgG in response to specific antigen or LPS as effectively as cultures of T cells, B cells, and FDCs from young mice.
(2) Comparison of old vs. Young B cells	LPS stimulated B cells from old mice produced IgG antibody as effectively as B cells from young mice when cultured with FDCs from young mice.
(3) Comparison of old vs. Young T cells	T cells from old mice provide T cell help as effectively as T cells from young mice when cultured with young FDCs and young B cells.
(4) Comparison of old vs. Young FDCs	Old FDCs were less effective than young FDCs in providing accessory activity needed for an IgG response in response to specific antigen or LPS when cultured with young T cells and young B cells. This lack of FDC accessory activity in aged FDCs can explain most of the reduced IgG production in cultures from old T cells, B cells and FDCs.

FDCs isolated from young and old mice with flow cytometry for ensuring the use of the same number of young and old FDCs in in vitro studies. The flow cytometric analysis showed that the number of FDCs remained much the same in both young and old mice (about 25% of the enriched fraction). Subsequent immunohistochemistry using the FDC-M1 monoclonal antibody essentially confirmed the flow cytometric findings. In the presence of old FDC, the OVA-induced antibody production was reduced to 45–50% of young FDC co-cultures at Day 14 (Fig. 1).

In order to differentiate between antigen handling capacity and co-stimulatory activity of FDCs, we extended our studies to an antigen independent system where we used LPS instead of OVA. We found a considerable reduction, over 80%, in LPS-induced antibody production in the presence of old FDCs in comparison to young FDCs (Aydar et al., 2002). The data suggest that aging not only interferes with antigen handling capacity of FDCs but it also deteriorates FDC co-stimulatory capacity.

Overall, Old FDCs were less effective than young FDCs in providing accessory activity needed for an IgG response in response to specific antigen or LPS when cultured with young T cells and young B cells. This lack of FDC accessory activity in aged FDCs can explain most of the reduced IgG production in cultures from old T cells, B cells and FDCs. The results of in vivo studies showed that old FDCs trap many fold less ICs and produce fewer iccosomes than young FDCs. Therefore, it appears that the lack of FDC accessory activity in aged FDCs is a consequence of reduced IC retention.

2.1. Old B and T cells show no apparent defect in the presence of young FDCs

Both B cells and T cells have been shown to be affected by aging (Ghia et al., 2000; Globerson and Effros, 2000; Klinman and Thorbecke, 1995). Therefore, it might be assumed

dc_1678_19

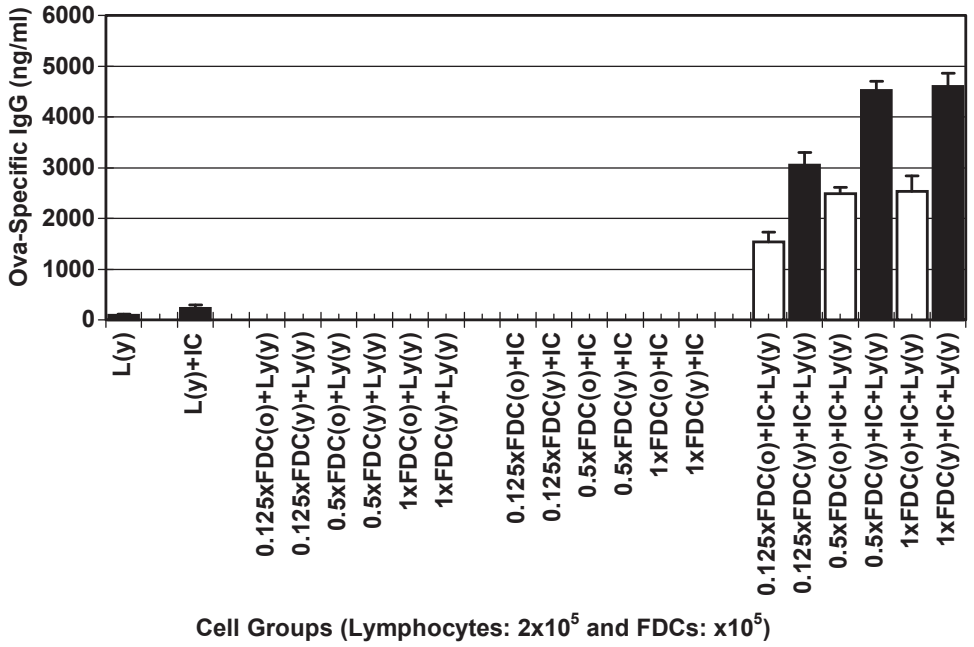


Fig. 1. Comparison of the ability of young and old FDCs to stimulate antibody production. FDCs were isolated from the draining lymph nodes of the mice. Both young and old FDCs were cultured in a 96-well culture plates in the presence of OVA–anti-OVA IC. Cultures were washed on Day 7 to remove any soluble IC, and anti-OVA IgG was measured on Day 14. Controls included young memory B and T lymphocytes alone, young memory B and T lymphocytes plus OVA–anti-OVA IC, young and old FDCs plus young memory B and T lymphocytes, and young and old FDCs and ICs. At each of the three FDC doses, the young FDCs were higher than the old FDCs ($P < 0.02$). These data are typical of three experiments of this type.

that the reduced immune response in vivo might result from the common age-associated defects of FDCs, B cells, and T cells. However, previous studies showed that J11D^{lo} cells—the precursors of GC B memory cells—were not altered by aging and responded to T-dependent antigen stimulation as vigorously as young B memory cells (Linton, 1993). In addition, recent adoptive transfer studies demonstrated that when aged B cells were adoptively transferred into young recipient mice, they produced equivalent levels of antigen specific antibody that underwent affinity maturation and isotype switching (Dailey et al., 2001). Thus, it might be expected that aging B cells will not interfere with antibody production. We also anticipated that T cell defects were negligible as very few T helper cells are thought to be involved in the interaction with B cells in the follicular microenvironment.

To test our reasoning, we conducted experiments where we co-cultured LPS-stimulated young (4 months) and old (22 months) lymphocytes in the presence of young FDCs (4 months). Since it was not possible to use old memory B cells, as these would be scarce in old animals due to an 80–90 percent reduction in the secondary antibody response, we used the same system as for the study of co-stimulation. The results showed that the level of antibody produced upon LPS-stimulation of young or old B cells was the same in the presence of young FDCs (Fig. 2). This finding suggests that the age of B cells does not contribute to the depressed antibody production.

dc_1678_19

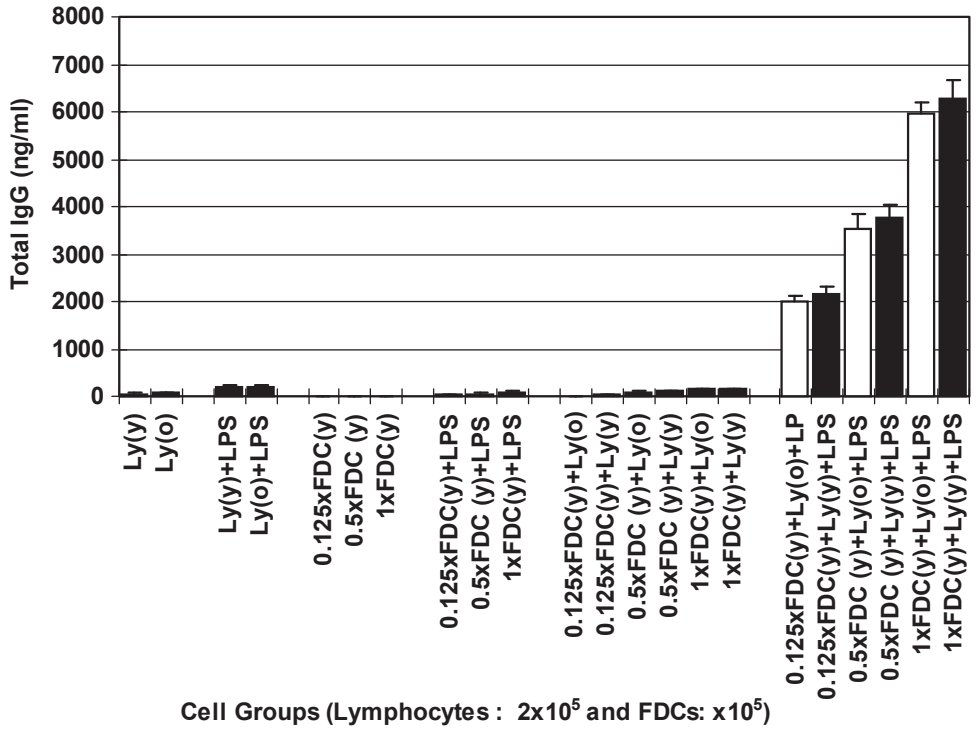


Fig. 2. Comparison of the ability of old and young B cells to produce antibody. Old B lymphocytes activated with LPS produced antibody as efficiently as young B lymphocytes upon co-culture with young FDCs over a dose range. Culture media was collected from Days 7 to 14 of culture and LPS-induced total IgG measured by a solid phase ELISA. These results are typical of three experiments of this type and are depicted as the mean SEM of total IgG produced. Controls included young, or old lymphocytes alone, young, or old lymphocytes plus LPS, young FDCs alone plus LPS; and young, or old lymphocytes plus young FDCs.

We also assessed the effect of aging of T cells for their contribution to antibody production in vitro using antigen primed old T cells and young memory B cells and young FDCs. The capacity of old T cells (22 months) to provide help was studied by co-culturing them with young B cells (4 months) and young FDCs (4 months) in the presence of OVA–anti-OVA immune complexes. The specific IgG measurement at Day 14 showed that old T cells worked as well as young T cells and that T cell help was not a limiting factor over a broad range of T–B cell ratios. The results from this study showed no apparent difference in antibody production between co-cultures using young or old T cells (Fig. 3). These observations are consistent with an earlier observation that the unresponsiveness of the aged spleen cells to the pneumococcal vaccines was not due to an intrinsic B cell defect or to T-cell mediated immunosupression but resulted from an accessory cell deficiency (Garg et al., 1996). Moreover, our findings confirmed and extended in vivo cell transfer studies showing that even after transfer of immune B and T cells, the anamnestic antibody response of old mice was still compromised (Burton et al., 1991).

dc_1678_19

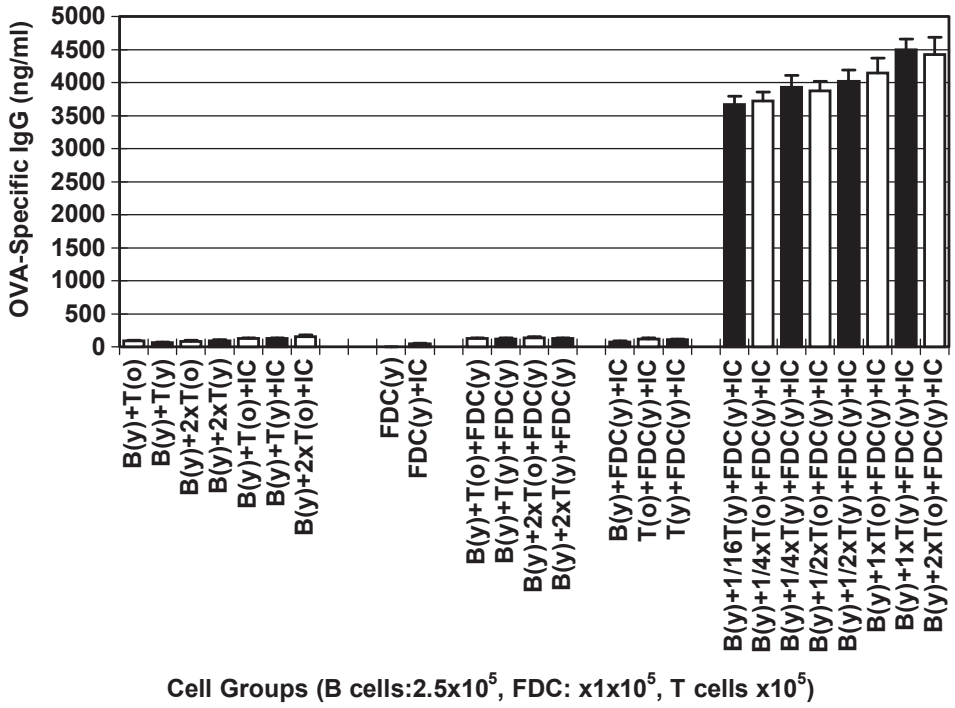


Fig. 3. Comparison of the ability of young and old T cells to provide B cell help. Decreasing numbers of T cells were co-cultured with constant number of young memory B cells (2.5×10^5) and FDCs (1×10^5). T cells were adjusted to in vivo ratios: $2 \times T = 30 \times 10^5$ cells; $1 \times T = 15 \times 10^5$ cells; $(1/2)T = 7.5 \times 10^5$ cells; $(1/4)T = 3.8 \times 10^5$ cells, and $(1/16)T = 0.95 \times 10^5$ cells. The capacity of old T cells to provide help showed no apparent deficit in antibody production in our in vitro cell culture model. All cultures were done in triplicate. Culture media was collected from Days 7 to 14 of culture and OVA-specific IgG measured by a solid phase ELISA. The results are typical of three experiments of this type and results are depicted as the mean SEM of specific IgG produced.

3. Status of important cell surface molecules on old versus young FDCs

Although the phenomenon of age-associated reduction in immune complex trapping in old mice is well known (Szakal et al., 1990, 1988), the cellular and molecular basis for this defect has not been defined. Age-related changes in immune complex trapping, reductions in the FDC-reticulum, GC numbers, and size prompted the hypothesis that in old mice, reduced IC retention is due to a defect in expression of surface receptors that involve IC trapping. To test this hypothesis, lymph node sections of actively immunized mice were immunohistochemically quantitated for FcγRII and CR1&2 receptors, for FDC-reticulum size (anti-FDC-M1), for the capacity to trap ICs (anti-FDC-M2), and for GCs (PNA). The basic features of the status of important cell surface molecules on old versus young FDCs are summarized in Table 2.

3.1. FDC-M1 in old mice

The FDC reactive mAb, FDC-M1, was used to assess the development of FDC-network and determine the size of FDC-reticula in OVA-immunized young and old mice. FDC-M1

dc_1678_19

Table 2
Status of important cell surface molecules in old vs. young FDCs

Feature	Associated phenomenon
(1) FDC-M1 in old mice	The intensity of labeling with FDC-M1 in old FDCS is comparable with young FDCs and the number of FDC-M1 positive FDCs is also comparable.
(2) FDC-M2 in old mice	Labeling with FDC-M2 is dramatically reduced in aged mice (>88%) consistent with a lack of antigen retained in the form of ICs.
(3) FDC complement receptors 1 and 2	Complement receptors 1 and 2 which are involved in trapping of antigen in the form of ICs is only slightly (∼18%) reduced on aged FDCs.
(4) FDC FcγRII	FcγRII is dramatically reduced on FDCs in aged mice (>90%). This receptor is known to be important in the trapping and retention of antigen–antibody complexes suggesting that this is a reason why IC retention in aged mice is reduced compared with young mice.

labeling showed surprisingly well-developed FDC-networks in old mice. FDC-M1 positive FDC-reticula enlarged gradually and peaked at Day 5 in both young and old mice. These immunohistochemical studies essentially confirmed our flow cytometric analysis (Aydar et al., 2002) and showed that both the average density of FDC-M1 labeling and FDC-reticulum size were similar in young and old mice (Table 2). It appears that aging does not affect the development and kinetics of FDC-network. The data further suggest that reduced IC trapping in old mice is not due to deficient FDC numbers in the reticula. This idea is confirmed by the reactivity of FDC-M2 monoclonal antibody with the FDC-network.

3.2. FDC-M2 in old mice

The reactivity of FDC-M2 with FDCs is dependent on trapped ICs capable of fixing complement. FDC-M2 reacts specifically with the C4 fragment of complement associated with the FDC-ICs (Taylor et al., 2002). Thus, FDC-M2 labeling closely reflects the location of ICs in the FDC-network. The kinetics of the FDC-M2 labeling was studied to obtain a functional parameter that reflects antigen localization that can be correlated with FcγRII and CR1&2 labeling of FDCs, both of which are functional in IC trapping. In young mice, the size of FDC-M2 positive FDC-reticulum increased gradually and peaked at Day 5 comparable with FDC-M1 and CR1&2 labeling. In old mice, however, the size of FDC-M2 positive FDC-reticula decreased by 88%, which suggested that although the aging FDC reticula maintains its structural integrity, it loses a large part of its functional capacity to hold ICs.

3.3. FDC complement receptors in old mice

Since it is known that complement also plays a significant role together with FcγRII in the trapping of ICs by FDCs, we examined the CR1&2 expression of FDCs in the reticula of draining lymph nodes using the anti-CR1&2 monoclonal antibody (clone 7G6). FDCs labeled intensely when compared with B cells. The average size of CR1&2 positive FDC-reticula in old mice was only slightly reduced (18%) but there was no significant difference between the CR1&2 positive FDC-reticulum size of young and old mice during the GC response (Table 2). Thus, old FDCs expressed CR1&2 within a normal range. Since no deficits in complement have been reported in aged individuals the lack of immune

dc_1678_19

complex retention is not likely to be due to a lack of complement or CR1&2 expression (Nagaki et al., 1980; Fukuoka et al., 1982; Oswald et al., 1990).

3.4. FDC FcγRII in old mice

Anti-FcγR monoclonal antibody (clone 2.4G2), which recognizes both mouse FcγRII and FcγRIII, was used to study FcγRII expression. The average density of FcγRII labeling on old FDCs was dramatically reduced (>70%) in the 3–10 day period of the GC reaction. Not only was the density reduced but FDC-network numbers and sizes were also radically diminished (>90%). In old mice, this reduction indicates that only some reticula have FDCs expressing FcγRII and not all of the FDCs in an FDC-M1 positive FDC-network express substantial levels of FcγRII. This observation correlates with the reduced IC trapping by old FDCs in IC localization studies (Szakal et al., 1988a,b), which was recently confirmed with FDC-M2 labeling in old mice. Moreover, reduced PNA positive GC numbers in old mice correlated well with FDC-M2 staining (Szakal et al., 1990). This further supports our previous observation that the ratio of the FDC-reticula determined by antigen trapping to GC numbers is 1:1 (Szakal et al., 1988a,b), emphasizing the dependence of GC development on antigen-bearing FDCs. Remarkably, although the number and size of FDC-M1 positive networks were similar in young and old mice, many old reticula that lacked FcγRII failed to trap ICs and were unable to support GC formation.

4. Evidence for an important interrelationship between FDC-FcγRII and B cells

The basic features of the interaction between FDC-FcγRII and B cells are summarized in Table 3. Recent results suggest that FDCs and B cells with wild-type levels of FcγRII give potent recall responses with antigen–antibody complexes capable of co-crosslinking BCR and FcγRII in B cells and initiating ITIM signaling. It was found that FDCs could inhibit SHIP phosphorylation, an early step in the ITIM pathway, induced by anti-BCR in B cells (Aydar et al., submitted for publication). FDCs derived from FcγRIIB$^{-/-}$ mouse or FDCs incubated with 2.4G2 (anti-FcγR) did not block SHIP phosphorylation indicating the importance of FcR in this process. It is also known that FDCs lacking FcγRIIB$^{-/-}$ or with blocked FcγRII supported only low level antibody production with wild-type B cells (Tew et al., 2001; Qin et al., 2000). We reasoned that FDCs bind Ig–Fc; minimize the co-crosslinking of BCR to B cell FcγRII and the subsequent activation of the ITIM. It follows, therefore, that the lack of FcγRII on old FDCs would correlate with ITIM activation as indicated by SHIP phosphorylation. To test this, A20 cells were stimulated using anti-BCR, an analog for antigen, and a well-known inducer of SHIP phosphorylation. Anti-BCR induced SHIP phosphorylation in the presence of young FDC was reduced by 60% of control (A20 cells cultured in the absence of FDCs). However, anti-BCR induced SHIP phosphorylation in the presence of old FDC was not reduced and was comparable to control A20 cells cultured in the absence of FDCs. From these observations it appears that the capacity of FDCs to trap ICs, will inhibit ITIM signaling, and promote B cell activation. This event deteriorates with aging and correlates with the reduced expression of FcγRII on old FDCs. This ultimately results in B cell inactivation and significantly depressed secondary antibody responses.

dc_1678_19

Table 3
Evidence for an important interrelationship between FcγRII levels on FDCs and B cells and the induction of IgG by ICs on FDCs

Feature	Associated phenomenon
(1) Normal FcγRII levels on B cells and FDCs	FDCs and B cells with wild-type levels of FcγRII give potent recall responses with antigen–antibody complexes capable of co-crosslinking BCR and FcγRII in B cells and initiating ITIM signaling.
(2) Lack of FcγRII on B cells and FDCs	FDCs and B cells from FcγRII$^{-/-}$ mice where co-crosslinking of BCR and FcγRII cannot occur give potent recall responses when challenged with antigen–antibody complexes.
(3) Lack of FcγRII on FDCs but present on B cells	FDCs from FcγRII$^{-/-}$ mice fail to elicit potent IgG responses when challenged with antigen–antibody complexes capable of co-crosslinking BCR and FcγRII. Similarly, wild-type FDCs with FcγRII blocked with specific antibody fail to stimulate potent IgG responses with wild-type B cells when challenged with antigen–antibody complexes.
(4) Low of FcγRII on old FDCs and a lack of FcγRII on B cells	Aged mice with low levels of FcγRII failed to induce a potent IgG response with wild-type B cells but induced potent IgG responses with B cells from FcγRII$^{-/-}$ mice where co-crosslinking of BCR and FcγRII cannot occur. The data suggest that the high levels of FcγRII on wild-type FDCs bind Ig–Fc and minimize co-crosslinking of BCR and FcγRII in B cells and facilitates a potent IgG response. The reduced level of FcγRII on aged FDCs represents a significant handicap in the ability of aged FDCs to stimulate a potent IgG response.

Due to the reduced FcγRII expression many IC-Fc are not tied down by FcγRII and are capable of cross-linking B cell BCR with B cell FcγRII and inactivate B cells. Thus, we further tested the ability of old FDCs to stimulate antibody production using FcγRIIB knockout B cells, where the free IC-Fc on FDCs cannot cross-link BCR with B cell FcγRII. Old FDCs cultured with IC-stimulated OVA-immune-FcγRIIB$^{-/-}$ lymphocytes increased antibody production to near normal levels. Aged mice with low levels of FcγRII failed to induce a potent IgG response with wild-type B cells but induced potent IgG responses with B cells from FcγRIIB$^{-/-}$ mice where co-crosslinking of BCR and FcγRII cannot occur. The data suggest that the high levels of FcγRII on wild-type FDCs bind Ig–Fc and minimize co-crosslinking of BCR and FcγRII on B cells and facilitate a potent IgG response. The reduced level of FcγRII on aged FDCs represents a significant handicap in the ability of aged FDCs to stimulate a potent IgG response.

5. Summary and conclusion

Recent data show that FcγRII receptors are highly expressed on the surface of young FDCs and the level of FcγRII expression on young FDCs is markedly higher than on

dc_1678_19

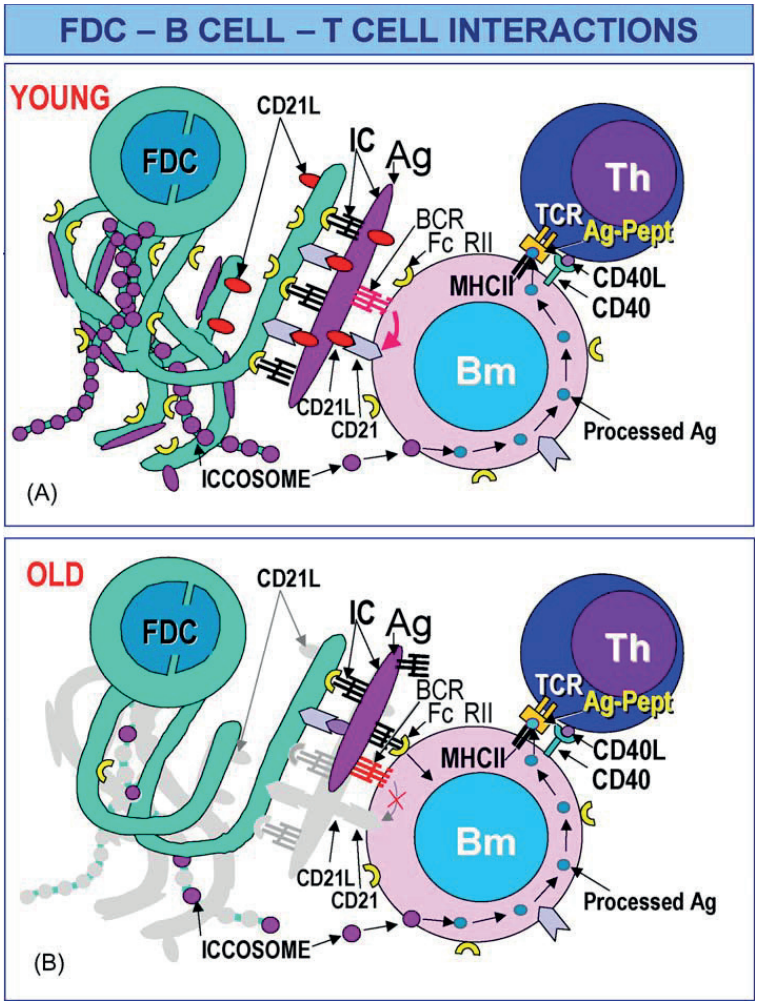


Fig. 4. (A) and (B) The differences in the molecular structure of FDC and its interaction with B cells in young and aged mice. B and T cell interactions are also shown. The absence of dendritic processes and FDC surface receptors are illustrated in aged mice as gray 'ghosts.' (1) (A) FDCs present intact antigen to the BCR for B cell activation and differentiation. (B) The presented antigen, in aged mice is much less due to the reduced number of FcγRII receptors. (2) (A) FDCs present intact antigen to the BCR along with a positive signal for B cell activation and differentiation. (B) In aged mice the antigen trapped is much less. (3) (A) FDCs also present a complement derived CD21L for ligation with B cell CD21. This co-signal is delivered for interaction with the CD21–CD19–TAPA-1 complex for activation and differentiation. (B) Hypothetically, in aged mice co-stimulation will be absent or reduced on account of the reduced amount of antigen trapped on FDCs resulting in the generation of fewer CD21L. (4) (A) FcγRII on FDCs will bind most Ig–Fc of antigen–antibody complexes. This will preempt the inhibitory signal to ITIM in the B cell (note FcγRII on B cell is not engaged). (B) In aged mice there are fewer FcγRII present on FDC dendrites, so some Ig–Fc on antigen may bind B cell FcγRII and inhibit B cells via the ITIM. (5) (A) FDCs also provide iccosomes for endocytosis by B cells for processing and presentation of the iccosomal antigen to T cells. (B) In aged mice there are much fewer iccosomes produced by the FDCs, and hypothetically, there would be less presentation of the processed antigen to T cells.

dc_1678_19

the surface of B cells. Our recent studies showed that in old mice FcγRII labeling was dramatically reduced on FDCs during the GC reaction. The reduction in FcγRII receptors may explain the reduced antigen trapping capacity in vivo and a reduced presence of antigen on FDCs in vitro. FDCs from FcγRIIB$^{-/-}$ mice do not trap and present ICs to B cells effectively either in vivo or in vitro. Antigen-specific B cells rapidly proliferate in response to antigen in young mice but in old mice antigen on FDCs is limited which would reduce proliferation. B cells in GCs must also be stimulated by antigen to remain viable and be able to differentiate into plasma cells and memory B cells. Since aged FDCs loose their capacity to retain ICs on their surface they fail to support GC formation and promote antibody production.

In summary, our working model is illustrated in Fig. 4. Since FcγRII receptors on the surface of young FDCs are markedly greater than on the surface of B cells, we reason the FcγRII on FDCs engage essentially all Ig–Fc in the antigen–antibody complexes. Thus, very little Ig–Fc is left that would be able to bind FcγRII on B cells and activate ITIM signaling by cross-linking with BCR (Fig. 4). FcγRII levels on old FDCs were low, particularly in the 3–10 day period after secondary immunization. Thus, we reason that old FDCs would not engage all (or most) Ig–Fc on the ICs (Fig. 4). This would allow B cell BCR and FcγRII receptors to be cross-linked, ITIM signaling to be initiated, and B cell maturation would then be inhibited and consequently aged mice would lack the ability to mount vigorous recall responses. Our studies further suggest that both the antigen handling capacity and co-stimulatory activity of FDCs from old mice are defective. Replenishing CD21L on aging FDCs repairs the defective co-stimulatory activity of aging FDCs. Thus, FDCs appear to form the “major bottle-neck” in aged animals in the anamnestic antibody response and GC reaction rather than B or T cells. This does not argue against the importance of age-related defects in certain populations of B or T cells but shows that as long as there are sufficient numbers of founder cells for a germinal center response it is the FDC that is limiting.

Acknowledgements

This research was supported by National Institutes of Health Grant AG-17063.

References

Aydar, Y., Balogh, P., Tew, J.G., Szakal, A.K., 2002. Age-related depression of FDC accessory functions and CD21 ligand-mediated repair of co-stimulation. Eur. J. Immunol. 32, 2817–2826.

Berek, C., Ziegner, M., 1993. The maturation of the immune response. Immunol Today 14, 400–404.

Burton, G.F., Kosco, M.H., Szakal, A.K., Tew, J.G., 1991. Iccosomes and the secondary antibody response. Immunology 73, 271–276.

Burton, G.F., Conrad, D.H., Szakal, A.K., Tew, J.G., 1993. Follicular dendritic cells and B cell costimulation. J. Immunol. 150, 31–38.

Callard, R.E., Basten, A., Waters, L.K., 1977. Immune function in aged mice. II. B-cell function. Cell Immunol. 31, 26–36.

Coico, R.F., Bhogal, B.S., Thorbecke, G.J., 1983. Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. J. Immunol. 131, 2254–2257.

dc_1678_19

Dailey, R.W., Eun, S.Y., Russell, C.E., Vogel, L.A., 2001. B cells of aged mice show decreased expansion in response to antigen, but are normal in effector function. Cell Immunol. 214, 99–109.

Fein, A.M., 1999. Pneumonia in the elderly: overview of diagnostic and therapeutic approaches. Clin Infect. Dis. 28, 726–729.

Freedman, A.S., Munro, J.M., Rice, G.E., Bevilacqua, M.P., Morimoto, C., McIntyre, B.W., Rhynhart, K., Pober, J.S., Nadler, L.M., 1990. Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-110. Science 249, 1030–1033.

Freedman, A.S., Munro, J.M., Morimoto, C., McIntyre, B.W., Rhynhart, K., Lee, N., Nadler, L.M., 1992. Follicular non-Hodgkin's lymphoma cell adhesion to normal germinal centers and neoplastic follicles involves very late antigen-4 and vascular cell adhesion molecule-1. Blood 79, 206–212.

Fukuoka, Y., Seino, J., Okuda, T., Tachibana, T., 1982. Development of a hemolytic assay for mouse complement components in sera and the variation of their levels with age. Tohoku J. Exp. Med. 137, 79–90.

Garg, M., Luo, W., Kaplan, A.M., Bondada, S., 1996. Cellular basis of decreased immune responses to pneumococcal vaccines in aged mice. Infect. Immun. 64, 4456–4462.

Ghia, P., Melchers, F., Rolink, A.G., 2000. Age-dependent changes in B lymphocyte development in man and mouse. Exp. Gerontol. 35, 159–165.

Globerson, A., Effros, R.B., 2000. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. Immunol. Today 21, 515–521.

Grouard, G., Durand, I., Filgueira, L., Banchereau, J., Liu, Y.J., 1996. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. Nature 384, 364–367.

Holmes, K.L., Schnizlein, C.T., Perkins, E.H., Tew, J.G., 1984. The effect of age on antigen retention in lymphoid follicles and in collagenous tissue of mice. Mech. Ageing Dev. 25, 243–255.

Klinman, N.R., Thorbecke, G.J., 1995. Aging associated changes in the generation and development of B cell memory. Int. Rev. Immunol. 12, 5–12.

Kosco, M.H., Szakal, A.K., Tew, J.G., 1988. In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. J. Immunol. 140, 354–360.

Kosco, M.H., Burton, G.F., Kapasi, Z.F., Szakal, A.K., Tew, J.G., 1989. Antibody-forming cell induction during an early phase of germinal centre development and its delay with ageing. Immunology 68, 312–318.

Linton, P.-J. The Status of Progenitors of Memory B Cells in Aged Mice, vol. 4. Mary Ann Liebert, Inc., La Jolla, CA 92037, 1993, pp. 35–46.

MacLennan, I.C., Gray, D., 1986. Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. Immunol. Rev. 91, 61–85.

Marrie, T.J., 2000. Community-acquired pneumonia in the elderly. Clin. Infect. Dis. 31, 1066–1078.

Murasko, D.M., Bernstein, E.D., Gardner, E.M., Gross, P., Munk, G., Dran, S., Abrutyn, E., 2002. Role of humoral and cell-mediated immunity in protection from influenza disease after immunization of healthy elderly. Exp. Gerontol. 37, 427–439.

Nagaki, K., Hiramatsu, S., Inai, S., Sasaki, A., 1980. The effect of aging on complement activity (CH50) and complement protein levels. J. Clin. Lab. Immunol. 3, 45–50.

Nicolle, L.E., 2002. Urinary tract infection in geriatric and institutionalized patients. Curr. Opin. Urol. 12, 51–55.

Oswald, I.P., Lantier, F., Bourgy, G., 1990. Classical and alternative pathway haemolytic activities of ovine complement: variations with age and sex. Vet. Immunol. Immunopathol. 24, 259–266.

Papamichail, M., Gutierrez, C., Embling, P., Johnson, P., Holborow, E.J., Pepys, M.B., 1975. Complement dependence of localisation of aggregated IgG in germinal centres. Scand. J. Immunol. 4, 343–347.

Pepys, M.B., 1974. Role of complement in induction of antibody production in vivo. Effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses. J. Exp. Med. 140, 126–145.

Powers, D.C., Belshe, R.B., 1993. Effect of age on cytotoxic T lymphocyte memory as well as serum and local antibody responses elicited by inactivated influenza virus vaccine. J. Infect. Dis. 167, 584–592.

Qin, D., Wu, J., Carroll, M.C., Burton, G.F., Szakal, A.K., Tew, J.G., 1998. Evidence for an important interaction between a complement-derived CD21 ligand on follicular dendritic cells and CD21 on B cells in the initiation of IgG responses. J. Immunol. 161, 4549–4554.

Qin, D., Wu, J., Vora, K.A., Ravetch, J.V., Szakal, A.K., Manser, T., Tew, J.G., 2000. Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. J. Immunol. 164, 6268–6275.

Rajagopalan, S., 2001. Tuberculosis and aging: a global health problem. Clin. Infect. Dis. 33, 1034–1039.

dc_1678_19

Saurwein-Teissl, M., Lung, T.L., Marx, F., Gschosser, C., Asch, E., Blasko, I., Parson, W., Bock, G., Schonitzer, D., Trannoy, E., Grubeck-Loebenstein, B., 2002. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+) CD28(−) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. J. Immunol. 168, 5893–5899.

Schnizlein, C.T., Szakal, A.K., Tew, J.G., 1984. Follicular dendritic cells in the regulation and maintenance of immune responses. Immunobiology 168, 391–402.

Schriever, F., Nadler, L.M., 1992. The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. Adv. Immunol. 51, 243–284.

Szakal, A.K., Tew, J.G., 1992. Follicular dendritic cells: B-cell proliferation and maturation. Cancer Res. 52, 5554–5556.

Szakal, A.K., Holmes, K.L., Tew, J.G., 1983. Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology. J. Immunol. 131, 1714–1727.

Szakal, A.K., Kosco, M.H., Tew, J.G., 1988a. A novel in vivo follicular dendritic cell-dependent iccosome-mediated mechanism for delivery of antigen to antigen-processing cells. J. Immunol. 140, 341–353.

Szakal, A.K., Taylor, J.K., Smith, J.P., Kosco, M.H., Burton, G.F., Tew, J.G., 1988b. Morphometry and kinetics antigen transport and developing antigen retaining reticulum of follicular dendritic cells in lymph nodes of aging immune mice. Aging: Immunol. Infect. Dis. 1, 7–22.

Szakal, A.K., Kosco, M.H., Tew, J.G., 1989. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: structure function relationships. Annu. Rev. Immunol. 7, 91–109.

Szakal, A.K., Taylor, J.K., Smith, J.P., Kosco, M.H., Burton, G.F., Tew, J.G., 1990. Kinetics of germinal center development in lymph nodes of young and aging immune mice. Anat. Rec. 227, 475–485.

Szakal, A.K., Kapasi, Z.F., Masuda, A., Tew, J.G., 1992. Follicular dendritic cells in the alternative antigen transport pathway: microenvironment, cellular events, age and retrovirus related alterations. Semin. Immunol. 4, 257–265.

Taylor, P.R., Pickering, M.C., Kosco-Vilbois, M.H., Walport, M.J., Botto, M., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., 2002. The follicular dendritic cell restricted epitope, FDC-M2, is complement C4; localization of immune complexes in mouse tissues. Eur. J. Immunol. 32, 1888–1896.

Tew, J.G., Mandel, T.E., 1979. Prolonged antigen half-life in the lymphoid follicles of specifically immunized mice. Immunology 37, 69–76.

Tew, J.G., Phipps, R.P., Mandel, T.E., 1980. The maintenance and regulation of the humoral immune response: persisting antigen and the role of follicular antigen-binding dendritic cells as accessory cells. Immunol. Rev. 53, 175–201.

Tew, J.G., Kosco, M.H., Szakal, A.K., 1989. The alternative antigen pathway. Immunol. Today 10, 229–232.

Tew, J.G., Kosco, M.H., Burton, G.F., Szakal, A.K., 1990. Follicular dendritic cells as accessory cells. Immunol. Rev. 117, 185–211.

Tew, J.G., Burton, G.F., Helm, S., Wu, J., Qin, D., Hahn, E., Szakal, A.K., 1995. Murine follicular dendritic cells: accessory activities in vitro. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 201, 93–104.

Tew, J.G., Wu, J., Fakher, M., Szakal, A.K., Qin, D., 2001. Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. Trends Immunol. 22, 361–367.

White, R.G., French, V.I., Stark, J.M., 1970. A study of the localisation of a protein antigen in the chicken spleen and its relation to the formation of germinal centres. J. Med. Microbiol. 3, 65–83.

Yoshida, K., van den Berg, T.K., Dijkstra, C.D., 1993. Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR gamma-II-mediated immune-complex trapping. Immunology 80, 34–39.

Yoshikawa, T.T., 2000. Epidemiology and unique aspects of aging and infectious diseases. Clin. Infect. Dis. 30, 931–933.

dc_1678_19

dc_1678_19
Check for updates

Article

Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2014, Vol. 62(6) 436–449
© The Author(s) 2014
Reprints and permissions:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1369/0022155414529595
jhc.sagepub.com
SAGE

Marginal Zone Macrophage Receptor MARCO Is Trapped in Conduits Formed by Follicular Dendritic Cells in the Spleen

Zoltán Kellermayer, Viktória Fisi, Martina Mihalj, Gergely Berta, József Kóbor, and Péter Balogh

Department of Immunology & Biotechnology (ZK,VF,MM,PB); Department of Medical Biology, (GB); Department of Oncotherapy (JK); and Lymphoid Organogenesis Research Group, Szentágothai János Research Center (ZK,PB) University of Pécs, Pécs, Hungary

Summary

The marginal zone (MZ) region of the spleen plays an important role in leukocyte traffic and the removal of blood-borne pathogens by resident macrophages. Macrophage receptor with a collagenous structure (MARCO), expressed by MZ macrophages, recognizes several microbial ligands and is also involved in the retention of MZ B cells. Here, we report that MARCO is also associated with follicular dendritic cells (FDCs) in the spleen. In its FDC-associated form MARCO is arranged in 0.3–0.5-μm diameter granular-fibrillar structures with an appearance similar to the white pulp conduit system formed by fibroblastic reticular cells (FRCs), but with different compartment preference. The follicular display of MARCO resists irradiation and requires the presence of both MZ macrophages and differentiated FDCs. The follicular delivery of MARCO is independent from the shuffling of marginal zone B cells, and it persists after clodronate liposome-mediated depletion of MZ macrophages. Our findings thus indicate that MARCO is distributed to both MZ and follicles within the spleen into conduit-like structures, where FDC-bound MARCO may mediate communication between the stromal microenvironments of MZ and follicles. (J Histochem Cytochem 62:436–449, 2014)

Keywords

MARCO, marginal zone macrophages, follicular dendritic cells, conduit

Introduction

The splenic marginal zone (MZ) is a complex anatomic compartment of the spleen in both humans and mice, where both innate and adaptive immune responses are generated against blood-borne pathogens. The innate immune responses are mediated by resident macrophages, which display a range of pattern-recognition receptors, whereas adaptive immune reactions involve specialized MZ B cells (Mebius and Kraal 2005; Kraal and Mebius 2006).

MZ macrophages are closely associated with MZ B cells that react preferentially with a restricted set of antigens associated with encapsulated bacteria in a T cell-independent manner. In addition, MZ B cells are also involved in the follicular delivery of soluble antigens, thus contributing to the initiation of germinal center reactions within the follicles of white pulp (Kraal and Mebius 2006). Here, follicular dendritic cells (FDCs) provide directional cues via the production of the CXCL13 chemokine and also the adhesion molecules for migration of B and T_{FH} cells as well as survival factors and antigenic fragments retained on their surface; this creates a suitable environment for the clonal expansion of activated B lymphocytes (Fu et al. 1998; Ansel et al. 2000; Cinamon et al. 2008). Both the differentiation of FDCs and the formation and preservation

Received for publication September 26, 2013; accepted March 4, 2014.

Corresponding Author:
Péter Balogh, Department of Immunology & Biotechnology, University of Pécs, Faculty of Medicine, Szigeti út 12., Pécs, H-7624, Hungary.
Email: balogh.peter@pte.hu

dc_1678_19

of proper architecture of the splenic MZ depend on the presence of B cells following the early postnatal period which, in turn, significantly influence the organism's capacity to establish effective humoral immune responses (Kapasi et al. 1993; Fu et al. 1998; Mackay et al. 1998; Balogh et al. 2001; Nolte et al. 2004).

Within the murine MZ, two main macrophage subsets can be distinguished according to their tissue location and phenotypic characteristics, and are arranged around the marginal sinus lining cells, which express MAdCAM-1 (mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1) (Mebius and Kraal 2005; Kraal and Mebius 2006). The follicular aspect of the MAdCAM-1^+ sinus-lining cell region contains metallophilic macrophages, which express sialoadhesin (Sn)/CD169 and other ligands for the cysteine-rich domain of mannose receptor (CR-MR/CD206). The red pulp aspect of the MAdCAM-1^+ marginal sinus MZ contains macrophages (MZMs) expressing macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) and SIGN-R1/CD209 (Mebius et al. 2004; Martinez-Pomares and Gordon 2012). Although SIGN-R1 and MARCO are co-expressed largely by the same MZM subpopulation, the development of $MARCO^+$ macrophages is independent from the activity of macrophage colony stimulating factor (M-CSF), as *op/op* mice with defective M-CSF production still present MARCO+ macrophages but both SIGN-$R1^+$ MZMs and $Sn/CD169^+$ metallophilic macrophages are absent (Ito et al. 1999). MARCO belongs to the Class A scavenger receptor family, which can also be induced by red pulp macrophages by exposure to TLR4 ligands (Elomaa et al. 1995; Kraal et al. 2000).

Several cellular and molecular connections between the MZ and follicles contribute to the initiation of immune responses. MZ B cells regularly enter the follicles and deliver complement-coated antigens onto FDCs (Cinamon et al. 2008), during which SIGN-R1, expressed by MZ macrophages, may bind complement C1q and lead to the subsequent local activation of the complement system (Kang et al. 2006). In addition, soluble ligands for CR-MR released from metallophilic macrophages may also be transported into follicles in immune responses, thus possibly representing a mechanism for the delivery of mannosylated antigens followed by FDC-mediated capture (Taylor et al. 2005). Therefore, both SIGN-R1 and Sn/CD169 produced by MZ macrophage subsets have been implicated in antigen transport processes from the marginal zone towards the follicles. MARCO, however, although prominently displayed by MZ macrophages, has not been investigated as a potential contributor in MZ-follicular communication. In this paper, we studied whether MARCO is involved in a transport route connecting MZ to follicles. We found that, in a tissue-specific fashion, MARCO may be distributed to FDCs in a process requiring differentiated FDCs and proper MZ architecture, and its retention by FDCs differs from that of activated complement C4.

Materials & Methods

Mice and Tissue Samples

Wild-type BALB/c mice at various ages were obtained from the SPF Unit of the Faculty of Medicine. *Nkx2-3*$^{-/-}$ mice (Pabst et al. 1999) were backcrossed onto BALB/c background through 14 generations and genotyped as described (Czömpöly et al. 2011), and maintained at the Department of Immunology and Biotechnology. Lymphotoxin beta-receptor (LTβR)-deficient mice (Fütterer et al. 1998) were kindly provided by Dr. Falk Weih (Jena, Germany). RAG1-deficient mice were purchased from The Jackson Laboratory (West Grove, PA). Clodronate liposome treatment (from ClodronateLiposome.org; Amsterdam, The Netherlands) was performed as previously described (van Rooijen and van Nieuwmegen 1984). All procedures involving live animals were conducted with the approval of the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of Pécs. Spleen tissue samples from mice deficient for CXCL13 and CXCR5 (Förster et al. 1996; Ansel et al. 2000) and expressing mutated $S1PR1^{TSS}$ (Arnon et al. 2011) were kindly provided by Dr. Jason Cyster (San Francisco, CA).

Antibodies and Reagents

Rat mAb against mouse fibroblastic reticular cell markers (clone ER-TR7) was kindly provided by Dr Willem van Ewijk (Rotterdam, The Netherlands). Anti-mouse Thy-1 (clone IBL-1) and anti-MARCO (clone IBL-12) mAbs were developed in our laboratory (Balogh et al. 1992; Kvell et al. 2006). Rat mAb against mouse C4 (clone FDC-M2) was provided by Dr. Andras K. Szakal (Taylor et al. 2002). FITC-conjugated anti-mouse CD21/35 mAb (clone 7G6) was purchased from BD Biosciences (Soft Flow Kft; Pécs, Hungary). For multicolor immunofluorescence IBL-12 mAb was conjugated with FITC or Cy3 according to standard procedures. Unlabeled rat mAbs were detected with phycoerythrin-conjugated or FITC-labeled goat anti-rat IgG purchased from BD Biosciences.

Visualization of Splenic Conduit

Ovalbumin (OVA) (Sigma-Aldrich; Budapest, Hungary) was used as a low-molecular weight tracer, labeled with FITC according to standard procedures. For conduit marking, mice were first intravenously injected with unconjugated OVA, followed by FITC-OVA, as described (Nolte et al. 2003). After 10 min, the spleens were removed,

dc_1678_19

snap-frozen and were processed for dual fluorescence labeling of the conduit system and MARCO using a IBL-12 Cy3 conjugate.

Immunofluorescence Staining

Frozen and acetone-fixed, 7-μm-thick sections from spleen and lymph nodes embedded in Killik cryomedium were blocked with 5% BSA in PBS for 20 min. The single- and dual-label immunofluorescence procedures on frozen sections from lymphoid tissues have been described previously (Kvell et al. 2006). For control rat IgG at 10 μg/ml was used. After mounting, the sections were viewed under an Olympus BX61 fluorescence microscope (Olympus Optical Co.; Tokyo, Japan). The acquisition of digital pictures with a CCD camera was performed using the analySIS software; the pictures were processed using Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA) with adjustments for brightness, contrast and black level applied equally to all images.

Confocal Microscopy Analysis and Morphometric Analysis

Confocal fluorescence images were taken using an Olympus Fluoview FV-1000 laser scanning confocal imaging system. Three dimensional reconstructions of Z-stacks were assembled in the Bitplane Imaris 4.2 software (Bitplane AG; Zurich, Switzerland) at the optical section thickness of 0.45 μm. Colocalization was analyzed with the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD) using the colocalization plug-in as described elsewhere (Talabér et al. 2009). Briefly, specific staining was distinguished from background based on pixel fluorescence intensities, and the colocalizing pixels were then counted on overlaid images. The rate of colocalized MARCO was determined as colocalized pixels/all $MARCO^+$ pixels.

Bone marrow chimeras

Fetal liver cells from E14.5 embryos or the bone marrow from 2-week-old Wistar rats were isolated by collagenase digestion or mechanical disruption (using a 25-gauge needle attached to a 2 ml syringe) and were used as donor cells for hematopoietic reconstitution (Balázs et al. 1998). Recipient BALB/c mice were irradiated at 10 Gy in split dosage administered 6 hr apart calculated at the midline level of the animals using Co^{60} source at the Department of Oncotherapy. The mice were then given an intravenous injection of 5×10^6 rat cells in the volume of 200 μl DMEM via the tail vein. Following reconstitution, the mice were provided with ciprofloxacin (Ciprobay®; Bayer Healthcare; Berlin, Germany) in their drinking water.

Flow Cytometry

Lymphocytes, isolated from the spleen or peripheral lymph nodes (pLN), were incubated with mAbs against complement factor C4 (clone FDC-M2) or MARCO (clone IBL-12) as an undiluted hybridoma supernatant, followed by PE-conjugated goat anti-rat IgG (BD Pharmingen; San Diego, CA). After washing, the residual binding sites of secondary reagent were saturated with 50× diluted normal rat serum, and were further incubated with a cocktail of FITC-labeled anti-CR1/2 (clone 7G6 from BD Pharmingen), Alexa Fluor 647-labeled anti-B220 mAb and biotinylated rat anti-mouse IgM (clone B7.6 from ATCC) in conjunction with streptavidin-PE-Cy5.5 (BD Pharmingen). In hematopoietic chimeras, the degree of chimerism was determined six weeks after reconstitution by flow cytometry of peripheral blood leukocytes using FITC-conjugated rat mAb against mouse CD45 (clone IBL-5/25, produced in our laboratory) and anti-rat CD45 (clone OX-1), as described (Balázs et al. 1998). After incubation and washing, the sample was hemolyzed using BD Biosciences lysing solution and fixed in 1% buffered paraformaldehyde. At least 10,000 lymphocytes were collected by a Becton-Dickinson FACSCalibur cytometer (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ) and analyzed using the CellQuest software gated on FSC/SSC to distinguish between lymphoid and myeloid cells.

Results

Tissue-specific Display of MARCO in Lymphoid Follicles

Previous observations indicated that various anti-MARCO antibodies, in addition to robust MZ macrophage labeling, show a specific reticular reactivity within the follicles (Kvell et al. 2006; Birjandi et al. 2011). To study this pattern in more detail, we first investigated the expression of MARCO in other peripheral lymphoid tissues. We confirmed that, in the spleen, MARCO could also be observed in follicles, in addition to its presence in the MZ (Fig. 1A). In contrast, in pLN, MARCO was absent from both the follicles and subcapsular planar floor (Fig. 1B). In Peyer's patches, we found no discernible staining for MARCO (not shown).

In the spleen, the follicle-associated MARCO had a strikingly different fine, thin, reticular morphology compared with the strong cell membrane-associated labeling in the MZ. High-powered inspection by immunofluorescence revealed that MARCO in follicles is arranged in 0.3–0.5-μm diameter branching fibrillar structures, with frequent granular enhancement of reactivity along the fibrils (Fig. 1C).

dc_1678_19

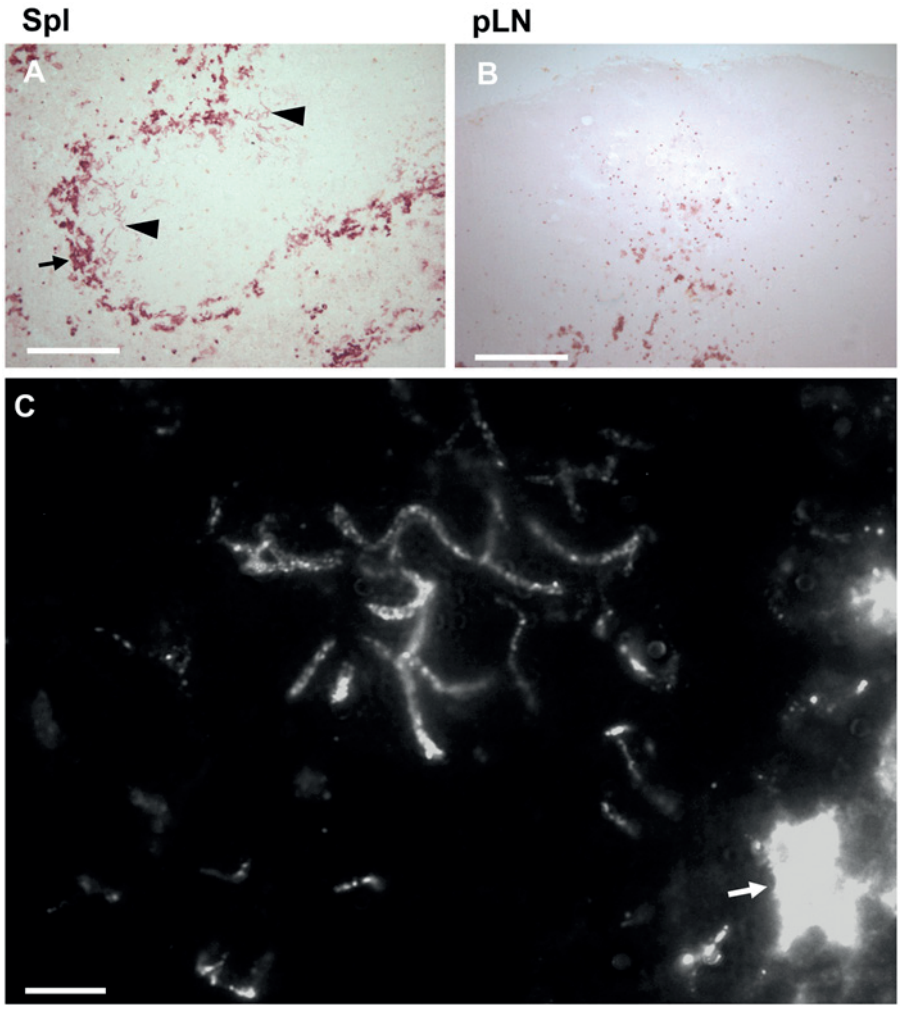


Figure 1. Differential expression of MARCO in follicles in lymph nodes and spleen. In spleen (Spl) (A), MARCO is strongly expressed in the marginal zone (MZ) macrophages (arrow), and in fine reticular form in the white pulp (arrowheads). In peripheral lymph nodes (pLN) (B), only medullary macrophage cords show intense cellular MARCO reactivity. High-powered fluorescent labeling of splenic sections (C) shows a continuous MARCO-positive fibrillary structure with granular enhancement of reactivity, in addition to the strong MZ labeling, as indicated by the arrow (n=4). Bar size in A, B=100 μm, in C=10 μm.

Follicular MARCO in the Spleen Is Associated with an FDC-based Conduit

We hypothesized FDCs as the probable candidate follicular stromal cell type that might be involved in the reticular display of MARCO within the splenic follicles. Using dual immunofluorescence, we found a close association between FDCs expressing a high level of CR1/2 (CD21/35) and reticular MARCO separate from the T-cell zone (Fig. 2A). The follicular MARCO appeared as a long, thin, linear reactivity, which, at higher power inspection, was revealed as a granular deposition arranged along impressions on the FDC cell membrane with occasional branching (Fig. 2B-2D). Three-dimensional reconstitution also indicated that follicular MARCO is retained in granular-fibrillar arrangement on the FDC surface (Fig. 2E). We also observed a similar co-localization using the FDC-M2 mAb against activated complement factor C4 as a passively acquired ligand for FDCs (Fig. 2F-2G). Morphometric quantitation revealed that approximately 60% of MARCO co-localizes with FDCs either as CR1/2^{high} or FDC-M2-positive cells (Fig. 2H), whereas approximately 10–20% of FDCs associate with MARCO.

This reticular staining raised the possibility that some MARCO might be associated with the splenic conduit system, a network established by fibroblastic reticular cells (FRCs) (Nolte et al. 2003; Lokmic et al. 2008). The conduit system can be identified by its reactivity with ER-TR7 mAb; therefore, we double-stained splenic sections with anti-MARCO and ER-TR7 mAbs. We found only occasional association between ER-TR7 reactivity and follicular MARCO expression (11% of follicular MARCO colocalizes with ER-TR7; data not shown), indicating that the physical platform that retains MARCO in the follicles is mostly distinct from the conduit system created by the FRC network (Fig. 2I). In addition, in vivo tracing of the conduit system by FITC-OVA also revealed that the follicular MARCO-positive compartment contained very little fluorescent OVA tracer, while FITC-OVA readily dissipated into the conduit network within the periarteriolar region, with only occasional co-labeling for MARCO (Fig. 2J). The combined in vivo OVA accumulation and MARCO immunofluorescence thus indicates that there is a clear segregation between the B-zone-associated MARCO-positive fibrils and T-zone-associated conduit, although some communication may exist between the two structures.

dc_1678_19

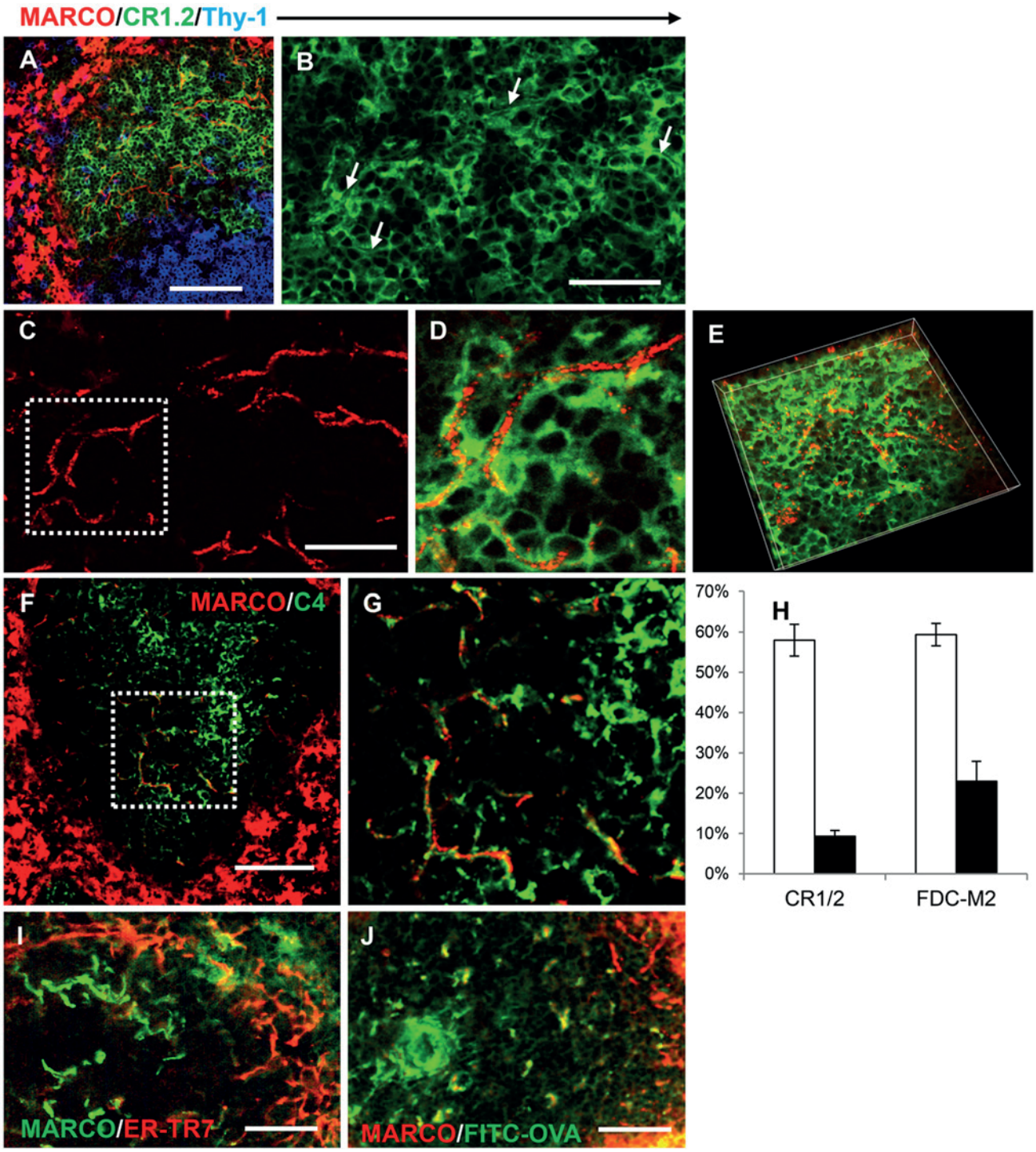


Figure 2. Follicular expression of MARCO is associated with follicular dendritic cells (FDCs). (A) A representative sample of young adult spleen labeled for T cells (blue, Thy-1/CD90), FDCs (green, CR1/2) and MARCO (red) show the orientation (bar size, 50 μm). High-powered magnification of CR1/2 reactivity reveals long linear impressions on the FDC membrane (in B indicated by arrows, bar size=10 μm) filled with MARCO-containing granules (C). The merged picture (D) shows the area outlined in (C). (E) 3D reconstitution of Z-stacks of a 15-μm-thick section reveals close spatial relationship between FDCs (green) and follicular MARCO (red). (F, G) Complement factor C4 (FDC-M2) bound to FDCs also co-localizes with MARCO-positive fibrils, with the area outlined in (F) represented in (G) (bar size in F, 50 μm). (H) Bar diagram showing the ratio (mean ± SEM) of intrafollicular MARCO co-localized with CR1/2 or FDC-M2 (open bars) and CR1/2 or FDC-M2+ FDCs associated with MARCO (filled bars) in young adult mouse spleen, quantified as described in Materials and Methods (n=5–7). T-zone-associated conduit material stained with the fibroblastic reticular cell marker ER-TR7 (I) or in vivo tracing with FITC-conjugated ovalbumin (FITC-OVA) (J) indicates only sparse co-labeling (n=5; bar size, 10 μm).

dc_1678_19

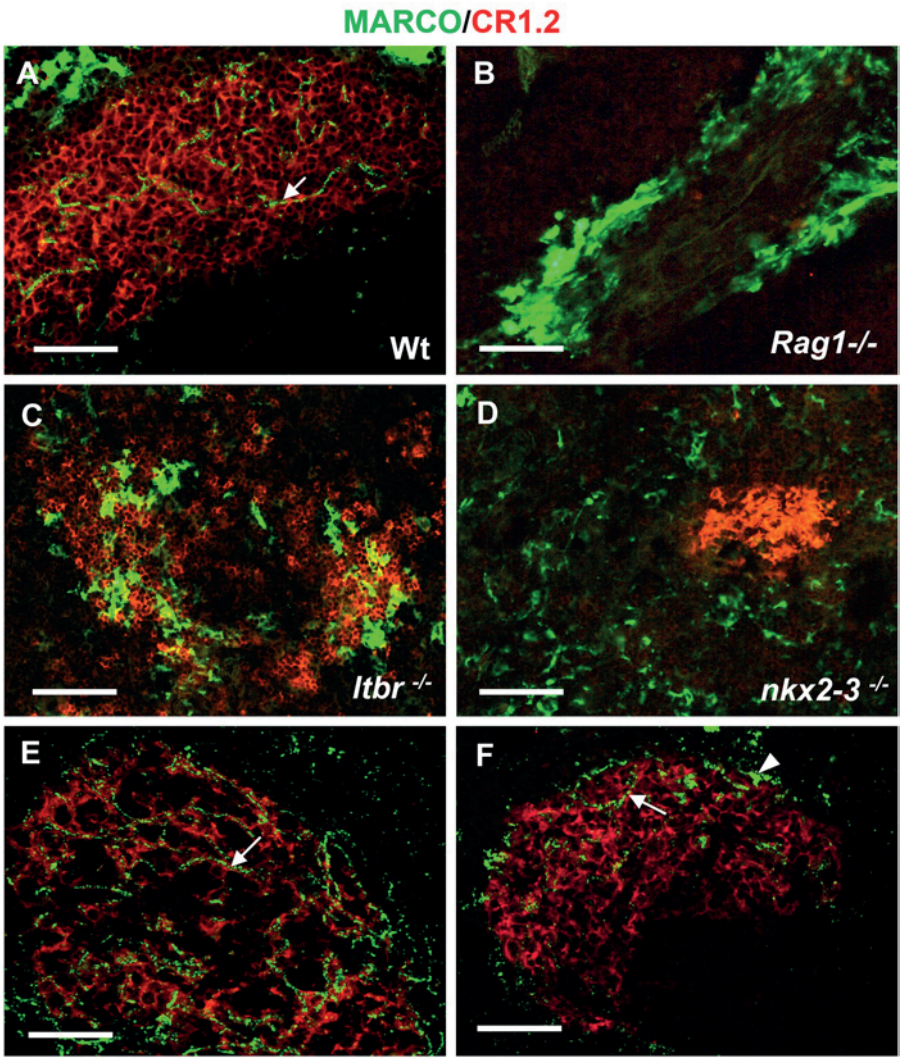


Figure 3. Follicular display of MARCO requires mature follicular dendritic cells (FDCs) and marginal zone (MZ). Splenic sections from wild-type spleen (A) or from mice with various mutations (indicated in each micrograph, B–D) that affect the splenic architecture are shown. The association between CR1/2 (red) and MARCO (green) in WT spleen (A) is indicated (arrow). Mice with blocked lymphoid development (RAG1-deficient mice, B) lack mature FDCs expressing CR1/2 and follicular MARCO+ conduits, but contain MZ macrophages. Mice deficient for LTβR (C) have disorganized white pulp and MZ structure, and lack white pulp-associated MARCO. Nkx2-3-deficient mice (D) are unable to establish follicular MARCO-positive conduits in the absence of MARCO-positive MZ macrophages (n=5 from each genotype). (E) Clodronate liposome-mediated depletion of MZ macrophages efficiently depleted the producer cells within 48 hr, whereas the follicle-associated MARCO persisted in a close association with FDCs. (F) Ten days later, both follicle-associated MARCO and partial MZ repopulation by MARCO-positive MZ macrophages can be observed (n=6). Arrows in A, E and F point to follicular MARCO; arrowhead in F indicates a MARCO-expressing MZ macrophage. Bar size, 50 μm.

The Follicular MARCO Deposition Requires Both Mature FDCs and MZ Macrophages

The parallel presence of follicular MARCO in spleen and its robust MZ-associated expression prompted us to determine which cells are required for this coupled display.

Using immunofluorescence, we first compared the distribution of MARCO in adult wild-type animals (Fig. 3A) to mice with various mutations (hematopoietic or stromal) that affect the formation of white pulp or the MZ. Hematopoietic alterations in *Rag1*$^{-/-}$ mice include the absence of mature T and B cells, which leads to atrophic white pulp formation and a blockade of FDC maturation (Fu et al. 1998). Stromal defects in mice lacking the Nkx2-3 homeodomain transcription factor (*Nkx2.3*$^{-/-}$) show defective MZ but with preserved differentiation of FDCs (Pabst et al. 1999; Czömpöly et al. 2011). Finally, in mutants lacking lymphotoxin beta-receptor (*ltbr*$^{-/-}$ mice), the MZ is severely disturbed and FDCs are absent (Fütterer et al. 1998).

In *Rag1*$^{-/-}$ mice, we found that, despite the presence of complete MARCO-positive MZ macrophage ring, there was no detectable MARCO-deposition within the small white pulp area (Fig. 3B). As expected, CD21/35-positive FDCs and B cells were absent.

Although *ltbr*$^{-/-}$ mice have a more discernible white pulp area, they lack CD21^{high} FDCs, and no reticular MARCO-reactivity could be observed, despite the presence of scattered CD21^{dim} B cells. Although some clusters of MARCO-positive cells were present at the boundary between the white pulp and red pulp, these cells did not form a continuous rim (Fig. 3C). In an inverse fashion, in *Nkx2-3*$^{-/-}$ spleen samples demonstrated the presence of compacted

dc_1678_19

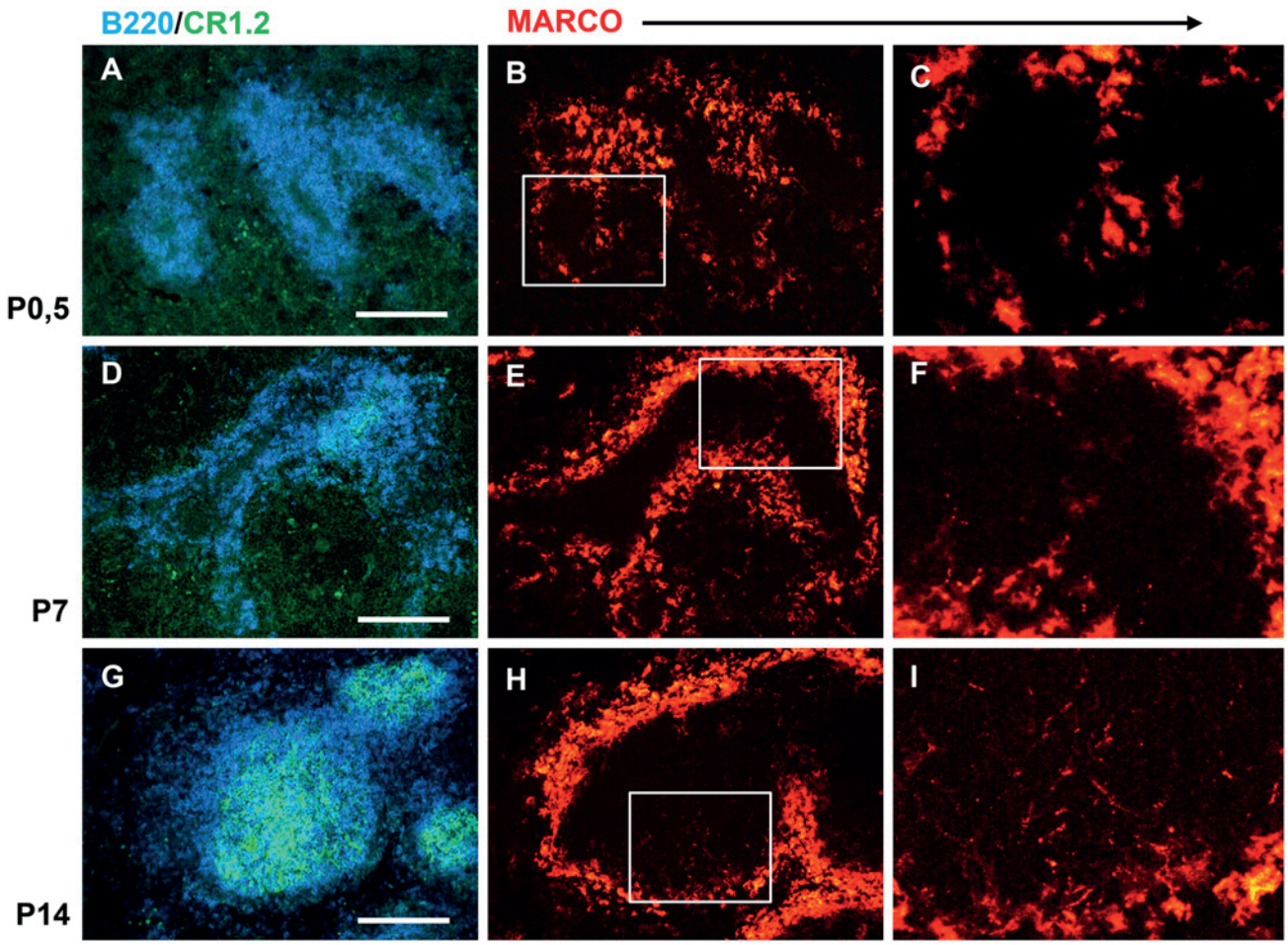


Figure 4. Postnatal kinetics of the establishment of follicular MARCO-positive conduits. Multiple immunofluorescence on splenic sections from neonatal (P0.5, A-C), 1-week-old (P7, D-F) and 2-week-old (G-I) mice are shown. B cells (blue) and follicular dendritic cells (FDCs; green) illustrate the gradual organization of follicles (A, D and G; bar size, 100μm). MARCO staining (red) identifies MZ macrophages and follicular MARCO-positive conduits (high-power magnification in C, F and I corresponds the white rectangles in B, E and H; *n*=5).

FDCs with intense CD21 expression, yet no FDC-associated MARCO could be detected. In these mice, only scattered MARCO-expressing cells were present in the spleen, without any characteristic appearance of MZ macrophages (Fig. 3D). Furthermore, the intravenous administration of clodronate liposomes (van Rooijen and van Nieuwmegen 1984) resulted in the depletion of MARCO-positive MZ macrophages within 48 hr, yet follicular MARCO persisted, and remained detectable until 10 days, when the MZ MARCO-positive macrophages started to repopulate the MZ (Fig. 3E-3F).

As the splenic stromal architecture in mice is established after birth with characteristic maturation sequence of both FDCs and MZ macrophages (Balogh et al. 2001; Nolte et al. 2003), next we studied the time course of the follicular MARCO emergence during the postnatal period in wild-type mice (Fig. 4). Using triple immunofluorescence for MARCO, FDC-associated CR1/2 (CD21/35) and B220 as B-cell marker in neonatal (P0.5), day 7 (P7) and day 14 (P14) spleens, respectively, we found that, in neonates, despite the presence of the MARCO-positive rim separating the red pulp and white pulp regions, there were no conduit-like MARCO components in the white pulp (Fig. 4A-4C). The immature stage of the follicles was revealed by the absence of FDCs and the perivascular accumulation of B cells. By P7, focal FDC maturation was evident by the appearance of small CR1/2-positive foci, and the presence of small, discontinuous, MARCO-positive granules in the white pulp area where discrete B cell clusters had formed (Fig. 4D-4F). By

dc_1678_19

the second week, fully developed follicles with extensive CR1/2-positive reticula were present, containing deeply penetrating MARCO-positive fibrils (Fig. 4G-4I). Taken together, these findings indicate that both organized MZ macrophages, which produce large quantities of MARCO, and mature FDCs are required together for the follicular deposition of MARCO. For the establishment of follicular MARCO-positive conduits, the emergence of mature FDCs appears as the rate-limiting event, which coincides with the establishment of B cell follicles.

Long-term Follicular Retention of MARCO by FDC Reticulum

As FDCs in mice have been demonstrated to be resistant to irradiation (Humphrey et al. 1984), next we tested whether the replacement of mouse hematopoietic cells with rat-derived leukocytes could affect the distribution of MARCO. Using either rat fetal liver (FL) or young adult bone marrow as a donor tissue, we found a high degree of rat chimerism six weeks after reconstitution in the peripheral blood in both lymphoid and myeloid lineages (Fig. 5A). In the immunofluorescent evaluation of the chimeric spleens, we observed deeply penetrating follicular MARCO associated with intensely CR1/2-positive cells. However, this CR1/2 staining between the chimeric and control samples was clearly different, as in chimeric spleens the CR1/2 labeling was restricted to the radiation-resistant FDCs (Fig. 5B), whereas in control samples, B cell-associated staining for CR1/2 was also detectable (Fig. 5C). Subsequent immunohistochemical analysis of the anti-MARCO rat mAb on wild-type rat spleen sections excluded its reactivity with the rat counterpart (not shown), indicating that the follicular MARCO in chimeric mice was of mouse origin. Therefore, we conclude that, despite the overwhelming replacement of circulating myeloid and lymphoid lineage cells in their blood, mouse MARCO was retained by radiation-resistant FDCs in irradiated chimeras.

MZ B cells Do Not Transport MARCO into Follicles

MZ B cells are known to transport complement-coated soluble antigens for FDC-mediated retention within the follicles (Ferguson et al. 2004; Cinamon et al. 2008). This is thought to occur under the guidance of BLC/CXCL13 chemokine binding to its receptor, CXCR5, in a process also requiring the desensitization of MZ B cells' S1PR1 receptor through its C-terminal region (Arnon et al. 2011). To investigate whether MZ B cells also deliver MARCO for follicular display, first we tested if MZ B cells co-express MARCO. Using multicolor flow cytometry, we found that MZ B cells (identified as $B220^{+}$, IgM^{high} and $CD21^{high}$ subset absent in pLNs) do not display MARCO, while they clearly express membrane-associated complement component C4 (Fig. 6A), as reported earlier (Cinamon et al, 2008). [3].

Next, we tested how blockade of the CXCL13/CXCR5 chemokine signaling pathway affects the follicular deposition of MARCO. We found that MARCO was restricted to the marginal zone in both CXCL13 and CXCR5 deficiencies (Fig. 6B-6C), in addition to the ring-like distribution of B cells and the absence of FDCs (Förster et al. 1996; Ansel et al. 2000).

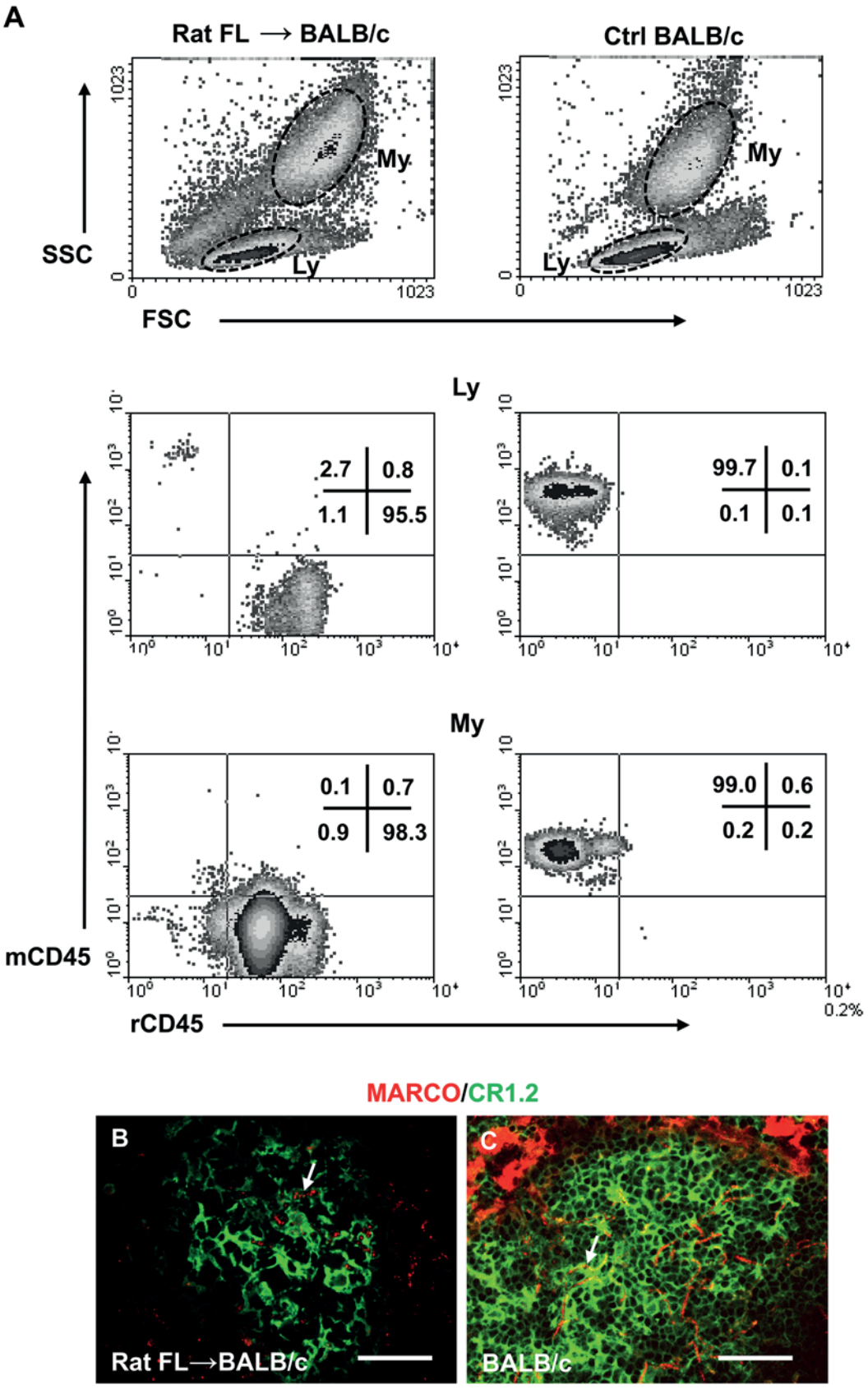
In contrast to these two mutants, in $S1PR1^{TSS}$ mice, where a TSS tripeptide replaces the AAA sequence in the C-terminal region of S1PR1 receptor, FDCs develop, and follicles form. Furthermore, the MZ B cells are blocked from entering the follicles and deposit captured immune complexes on the surface of FDCs (Arnon et al. 2011). We found that, despite the follicular exclusion of MZ B cells, $S1PR1^{TSS}$ mice had abundant follicular display of MARCO similar to wild-type mice (Fig. 6D, 6E). Taken together, these findings suggest that MARCO is deposited within the follicles without the involvement of MZ B cell movement. On the other hand, the CXCR5/CXCL13-driven B cell migration into the developing white pulp territory is necessary for the follicular deposition of MARCO through the induction of FDC reticula.

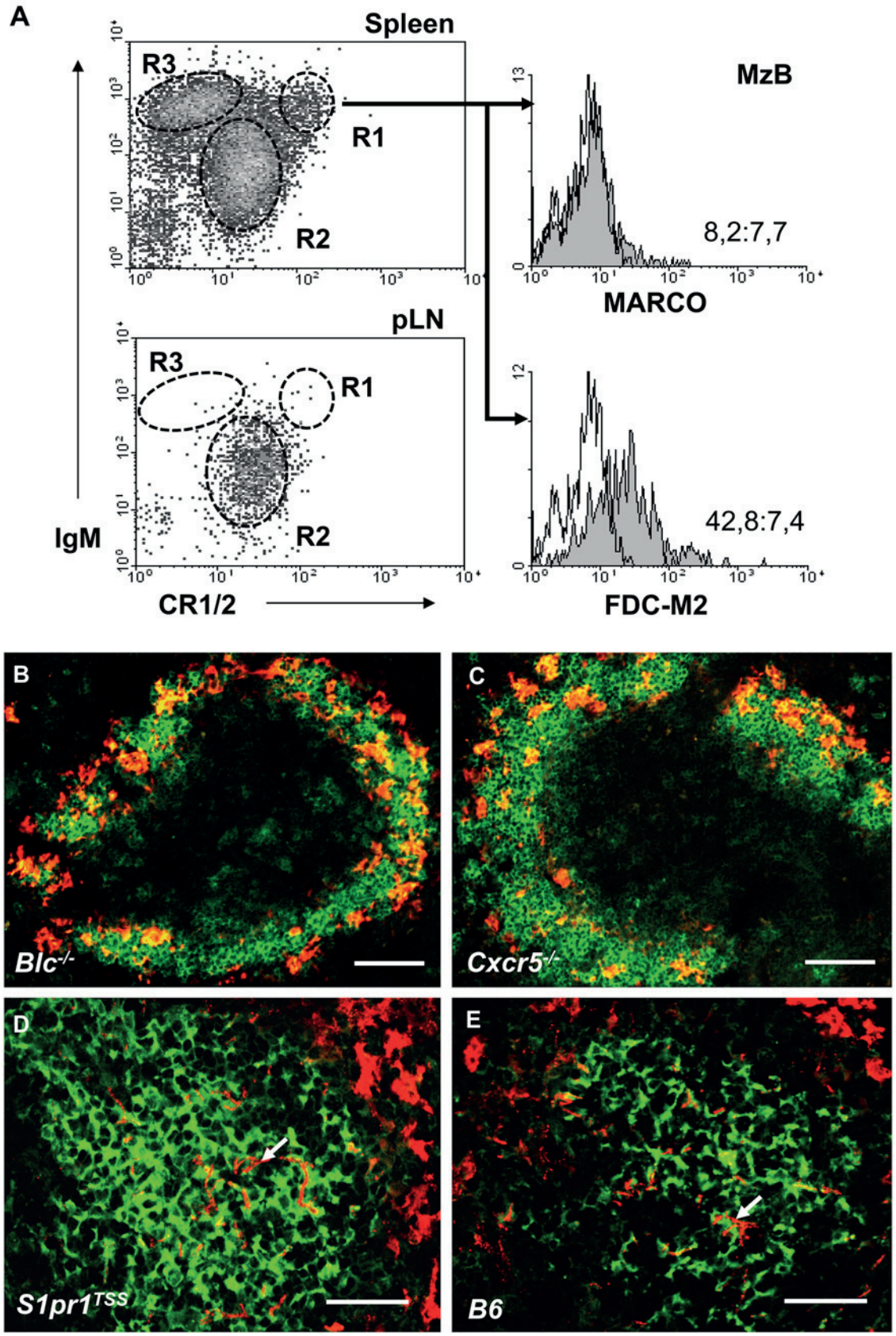
Discussion

In our present work, we describe the follicular distribution of MARCO, a marginal zone macrophage-associated scavenger receptor in mouse spleen, which may point to the existence of a tissue-specific transport system within splenic follicles. MARCO, a Class A scavenger receptor, was first identified as a trimeric protein formed by 518 amino acids monomers, capable of binding bacteria and acetylated low density lipoprotein, with its mRNA expression restricted to the splenic marginal zone (Elomaa et al. 1995; Kraal et al. 2000). Interestingly, although the follicular deposition of

Figure 5. Radiation resistance of marginal zone (MZ)-follicular MARCO distribution pathway. BALB/c mice were irradiated and repopulated using rat fetal liver hematopoietic or rat bone marrow cells. The peripheral blood was analyzed by flow cytometry and compared with that of control mice. (A, top pair) Lymphoid (Ly) and myeloid (My) cells were defined according to their size (forward scatter/FSC) and granularity (side scatter/SSC). (A, bottom four) The degree of chimerism is shown on the basis of rat (r) CD45 or mouse (m) CD45 expression in peripheral blood leukocytes (middle/lymphoid gate and lower/myeloid gate density plots, respectively), where the quadrant numbers correspond to the percentage values of gated cells (n=6). (B, C) Splenic sections from 6-weeks post-transplant (B) chimeric and (C) control BALB/c mice stained for MARCO (red) and CR1/2 (green) show the follicular retention of MARCO (arrows) (n=6). Bar size, 50μm.

dc_1678_19


A
Rat FL → BALB/c
Ctrl BALB/c
My
Ly
SSC
FSC
0
1023
Ly
2.7
0.8
1.1
95.5
99.7
0.1
0.1
0.1
My
0.1
0.7
0.9
98.3
99.0
0.6
0.2
0.2
mCD45
rCD45
0.2%
MARCO/CR1.2
B
Rat FL→BALB/c
C
BALB/c


A
Spleen
R3
R1
R2
MzB
8,2:7,7
MARCO
pLN
R3
R1
R2
IgM
CR1/2
42,8:7,4
FDC-M2
B
Blc-/-
C
Cxcr5-/-
D
S1pr1TSS
E
B6

dc_1678_19

MARCO has already been illustrated in other publications (Kvell et al. 2006; Birjandi et al. 2011), its comprehensive characterization is missing. These structures appear to require the simultaneous presence of MARCO-positive marginal zone macrophages and follicular dendritic cells (FDCs), and they differ from the conduit system of the T-zone that has been described for peripheral lymph nodes in two main aspects (Gretz et al. 1996; Nolte et al. 2003; Lokmic et al. 2008): First, follicular MARCO is restricted to the spleen, and is absent in other lymphoid tissues; second, unlike the conduit network created by fibroblastic reticular cell (FRC) ensheathing extracellular matrix components they themselves produce, this MARCO-positive network is probably the result of FDCs passively capturing MARCO generated by MZ macrophages, as evidenced in mutant mice with various abnormalities of distinct regions in the spleen. In this way, a MARCO-transport pathway can be envisaged to exist in the mouse spleen, connecting the MZ macrophages to the follicular stroma.

The splenic T-zone-associated conduit system is characterized by the expression of the ER-TR7 mAb-reactive material, which is produced by FRCs. Double labeling for ER-TR7 and MARCO revealed that the latter network does not expand into the T-zone conduits. Furthermore, in vivo tracing using FITC-OVA also indicated that, although T-zone-associated white pulp conduits expand from the central artery along the ER-TR7-positive meshwork towards the follicles with a decreasing amount of tracer, the transport of MARCO may be directed in the opposite direction from the MZ towards the follicles, without seeping towards the red pulp.

This difference between the dissipation gradient of OVA-tracer and MARCO in the spleen parallels the distinct cellular composition of conduits present in separate compartments of peripheral lymphoid tissues. Ontogenic studies suggest that the formation and maintenance of splenic FDCs involve the peripheral region of white pulp where FDC precursors first appear (Balogh et al. 2001) and their emergence is coupled with the remodeling of the follicular conduit system (Bajénoff et al. 2009). It appears that both mature FDCs and MZ macrophages are required for the proper formation of follicular MARCO-positive conduits, as mice with defective FDC maturation (such as in RAG1 mutants), complex follicular-MZ organization (LTβR), or primarily MZ macrophage deficiency (Nkx2-3 mutation) are unable to establish white pulp/follicular MARCO conduits. In lymph nodes, however, there is no MARCO-source available along the liquid flow upstream to FDCs. Intriguingly, exposure to supralethal irradiation dose—despite the exchange of mouse B cells for rat lymphocytes—did not abolish the follicular retention of MARCO, arguing for the close stromal relatedness of the process. It remains to be investigated that beyond these cellular requirements which extracellular matrix molecules characteristic of lymphoid conduits (Lokmic et al. 2008) are present together with FDC-associated MARCO.

MARCO-deficient mice show delayed formation of MZ architecture, scattered MZ macrophage distribution and a weakened immune response against T-independent Type 2 antigens (Chen et al. 2005), whereas its acute blockade with specific mAb induced the mobilization of MZ B cells, also indicating some role for MARCO in the retention of MZ B cells (Karlsson et al. 2003). However, while anti-MARCO mAbs may interrupt the C4-directed MZ B cell binding to MARCO (thus mobilizing the MZ B cells), the absence of MARCO on MZ B cells excludes the direct involvement of MZ B cells as MARCO carrier cells. Therefore, the role of B cells in the formation of follicular MARCO network probably manifests through their role in the establishment of proper MZ architecture and FDC development (Kapasi et al. 1993; Nolte et al. 2004), but not in the direct transportation, which may occur via other mechanisms.

Complement C4 (Chen et al. 2006)—an important opsonin for subsequent recognition by complement receptors CR1/2, which influences the distribution of immune complexes between MZ and follicles (Zachrau et al. 2004)—was raised as potential endogenous ligand for MARCO. Considering the role of C4 in the antigen handling processes, a B cell-mediated MARCO transport mechanism could be envisaged in which MZ B cells, with a high-level expression of CR1/2, may capture complement-coated immune complexes (Humphrey et al. 1984) and also bind to complement C4 associated with MARCO on MZ macrophages. The absence of detectable MARCO on MZ B cells by flow cytometry, however, excludes this possibility.

Figure 6. Transport of marginal zone (MZ) MARCO into follicles is independent of MZ B-cell shuffling. Splenic lymphocytes from BALB/c mice were labeled with anti-CR1/2 and anti-IgM to distinguish MZ B cells (in R1 gate) from follicular B cells (in R2 gate) and immature B cells (in R3 gate), and also lymphocytes from peripheral lymph node cells, used as a staining control (A, left top and lower). Histogram overlays show the lack of MARCO (top right) and the presence of detectable complement C4 (lower right) on MZ B cells corresponding to R1 gate (filled histogram) as compared with the isotype control (empty histogram). Numbers in the representative histogram overlays indicate the ratio of mean fluorescence intensities (MFI) between the expression of MARCO or C4 and isotype control (n=5). (B-E) shows the distribution of MARCO (red) and follicular dendritic cell (FDC)-associated CR1/2 (green) in (B) *Blc*$^{-/-}$, (C) *Cxcr5*$^{-/-}$ and (D) *S1pr1*^{TSS} transgenic mutants affecting follicular migration of B cells as compared with the (E) B6 wild-type control sample. Note the absence of follicles and CR1/2^{high} FDCs in mice deficient for BLC/CXCL13 and CXCR5. Arrows in (D) and (E) point to FDC-associated MARCO (n=2–4). Bar size in B/C, 100μm; in D/E, 20μm.

dc_1678_19

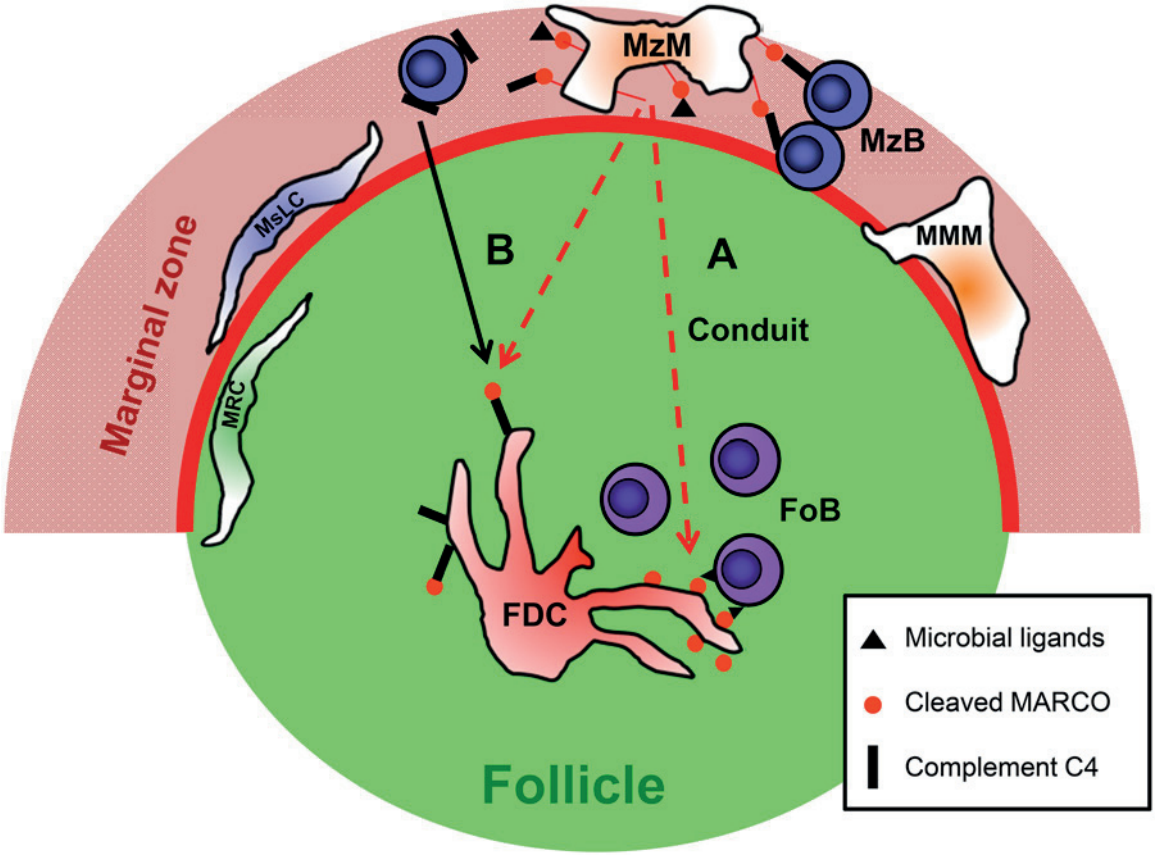


Figure 7. A hypothetical scheme of the follicular transport of MARCO into follicles in the murine spleen. Marginal zone macrophages (MZM) display MARCO (red dot with red rod), which may potentially form a complex with microbial ligands (black triangles) or complement C4 (black rectangles), can bridge MZ B cells via the latter cells' recognition of CD21 ligands. Following proteolytic cleavage or other processing events, soluble MARCO (with or without complement C4 or microbial compounds) would hypothetically dissipate across the marginal sinus (thick red line) into the follicle via either (A) the pre-formed conduits, which allows it to then pass onto follicular dendritic cells (FDCs), or (B) be passively acquired by C4 bound to CD21 on FDCs, which allows it to be deposited earlier by MZ B cells (continuous black arrow). Thus, FDCs may either immobilize soluble MARCO:C4, or MARCO is deposited into FDC-associated conduits, where microbial ligands bound to MARCO may be recognized by follicular B cells (FoB). Possible roles of marginal metallophilic macrophages (MMM) and other stromal elements (marginal sinus lining cells – MsLC and marginal reticular cells – MRC) remain unknown. The regulatory roles of B cells in the formation of MZ architecture and FDC differentiation are not depicted.

Because of the size restriction of the white pulp conduit system in accommodating molecules below 70 kDa for follicular transport, it is probable that some reduced variant or monomeric form of MARCO may be processed. As the IBL-12 mAb used in our studies binds to the epitope involved in Ac-LDL binding within the SRCR domain (Kvell et al. 2006), MARCO in a follicular reticular form may potentially preserve this ligand-binding site.

MARCO may bind zymosan, *Candida albicans*, lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and also unopsonized particles, possibly through several ligand-binding sites (Kraal et al. 2000). Once acquired, MARCO on FDCs may support B cell responses via several interactions, including TLR4 expressed by FDCs (El Shikh et al. 2007) or through CR21/35, if MARCO is complexed with C4 degradation products. Only the spleen has been found to contain such a follicular structure, and therefore splenic B cells are likely to be exposed to a different follicular milieu than B cells of other tissues lacking FDC-associated MARCO. Considering the broad microbial ligand-binding potential of MARCO, its association with fungal or bacterial compounds for subsequent recognition by B cells, such as that of LPS by TLR4, may augment the latter cells' antigen receptor-evoked signaling responses. Alternatively, released MARCO may act as an adsorbent for such microbial components, thus preventing their dissipation into the lymphoid tissue. Moreover, the absence of macrophage-associated MARCO impairs resistance against bacterial infection (Arredouani et al. 2004), but its absence confers protection in influenza viral infection in the lung (Ghosh et al. 2011), indicating that the antimicrobial effects of MARCO probably manifest in an agent-dependent fashion. Figure 7 represents an overview of

dc_1678_19

the proposed formation of follicular MARCO and its possible involvement in connecting the MZ and follicles in the mouse spleen.

In summary, the splenic MARCO-containing conduit system represents a unique spleen-specific structure, with complex developmental requirements. It may form a physical platform between the marginal zone and follicular stroma, thus promoting the connection between these two distinct lymphoid compartments.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the spleen samples of *Blc*$^{-/-}$, *Cxcr5*$^{-/-}$ and S1PR1^{TSS} mice kindly provided by Dr. Jason Cyster (University of California, San Francisco). The ER-TR7 mAb was generously supplied by Dr. Willem van Ewijk.

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.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by SROP-4.2.2/B-10/1-2010-0029 and HEALTH IMPULSE (HUHR/1001/2.1.3/0006) project grant at the University of Pécs. ZK was supported by the by the Apáczai Csere János Fellowship in the framework of TÁMOP 4.2.4. A/1-11-1-2012-0001 'National Excellence Program'. P.B. was in part supported by the Research Fund of the Faculty of Medicine of the University of Pécs, and is recipient of the research grant IBD-0341 from the Broad Medical Research Program of The Eli and Edythe Broad Foundation and the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K108429). The authors have no conflicting financial interests.

References

Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther S.A, Förster R, Sedgwick JD, Browning JL, Lipp M, Cyster JG (2000). A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. Nature 406:309-314.

Arnon TI, Xu Y, Lo C, Pham T, An J, Coughlin S., Dorn GW, Cyster JG (2011). GRK2-dependent S1PR1 desensitization is required for lymphocytes to overcome their attraction to blood. Science 333:1898-1903.

Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K, Kobzik L (2004). The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. J Exp Med 200:267-272.

Bajénoff M, Germain RN (2009). B-cell follicle development remodels the conduit system and allows soluble antigen delivery to follicular dendritic cells. Blood 114: 4989-4997.

Balázs M, Horváth G, Balogh P (1998). Simple determination of donor/host origin and donor leukocyte subsets in rat-mouse chimeras. J Immunol Methods 218:117-121.

Balogh P, Bebök Z, Németh P (1992). Cellular enzyme-linked immunocircle assay. A rapid assay of hybridomas produced against cell surface antigens. J Immunol Methods 153:141-149.

Balogh P, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK (2001). Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. Cell Immunol 214:45-53.

Birjandi SZ, Ippolito JA, Ramadorai AK, Witte PL (2011). Alterations in marginal zone macrophages and marginal zone B cells in old mice. J Immunol 186:3441-3451.

Chen Y, Pikkarainen T, Elomaa O, Soininen R, Kodama T, Kraal G, Tryggvason K. (2005). Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. J Immunol 175:8173-8180.

Chen Y, Sankala M, Ojala JR, Sun Y, Tuuttila A, Isenman DE, Tryggvason K, Pikkarainen T (2006). A phage display screen and binding studies with acetylated low density lipoprotein provide evidence for the importance of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain in the ligand-binding function of MARCO. J Biol Chem 281:12767-13775.

Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW Jr, Cyster JG (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. Nat Immunol 9:54-62.

Czömpöly T, Lábadi A, Kellermayer Z, Olasz K, Arnold HH, Balogh P (2011). Transcription factor Nkx2-3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen. J Immunol 186: 6981-6989.

Elomaa O, Kangas M, Sahlberg C, Tuukkanen J, Sormunen R, Liakka A, Thesleff I, Kraal G, Tryggvason K (1995). Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. Cell 80:603-609.

El Shikh ME, El Sayed RM, Wu Y, Szakal AK, Tew JG (2007). TLR4 on follicular dendritic cells: an activation pathway that promotes accessory activity. J Immunol 179:4444-4450.

Ferguson AR, Youd ME, Corley RB (2004). Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. Int Immunol 16:1411-1422.

Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M (1996). A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. Cell 87:1037-1047.

Fu YX, Huang G, Wang Y, Chaplin DD (1998). B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin α–dependent fashion. J Exp Med 187:1009-1008.

Fütterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. Immunity 9:59-70.

Ghosh S, Gregory D, Smith A, Kobzik L (2011). MARCO regulates early inflammatory responses against influenza: a useful macrophage function with adverse outcome. Am J Respir Cell Mol Biol 45:1036-1044.

Gretz JE, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S (1996). Sophisticated strategies for information encounter in the lymph node: the reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic. J Immunol 157:495-499.

Humphrey JH, Grennan D, Sundaram V (1984). The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism

dc_1678_19

of trapping of immune complexes on them. Eur J Immunol 14:859-864.

Ito S, Naito M, Kobayashi Y, Takatsuka H, Jiang S, Usuda H, Umezu H, Hasegawa G, Arakawa M, Shultz LD, Elomaa O, Tryggvason K (1999). Roles of a macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) in host defense and heterogeneity of splenic marginal zone macrophages. Arch Histol Cytol 62:83-95.

Kang YS, Do Y, Lee HK, Park SH, Cheong C, Lynch RM, Loeffler JM, Steinman RM, Park CG (2006). A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. Cell 125:47-58.

Kapasi ZF, Burton GF, Shultz LD, Tew JG, Szakal AK (1993). Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. J Immunol 150:2648-2658.

Karlsson MC, Guinamard R, Bolland S, Sankala M, Steinman RM, Ravetch JV (2003). Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. J Exp Med 198:333-340.

Kraal G, van der Laan LJ, Elomaa O, Tryggvason K (2000). The macrophage receptor MARCO. Microbes Infect 2:313-316.

Kraal G, Mebius RE (2006). New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. Int Rev Cytol 250:175-215.

Kvell K, Czömpöly T, Pikkarainen T, Balogh P (2006). Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. Biochem Biophys Res Commun 341:1193-202.

Lokmic Z, Lämmermann T, Sixt M, Cardell S, Hallmann R, Sorokin L (2008). The extracellular matrix of the spleen as a potential organizer of immune cell compartments. Semin Immunol 20:4-13.

Mackay F, Browning JL, Kosco-Vilbois MH, Noelle RJ (1998). The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. J Exp Med 187:997-1007.

Martinez-Pomares L, Gordon S (2012). CD169+ macrophages at the crossroads of antigen presentation. Trends Immunol 33:66-70.

Mebius RE, Nolte MA, Kraal G (2004). Development and function of the splenic marginal zone. Crit Rev Immunol 24:449-464.

Mebius RE, Kraal G (2005). Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol 5:606-616.

Nolte MA, Beliën JA, Schadee-Eestermans I, Jansen W, Unger WW, van Rooijen N, Kraal G, Mebius RE (2003). A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. J Exp Med 198:505-512.

Nolte MA, Arens R, Kraus M, van Oers MH, Kraal G, van Lier RA, Mebius RE (2004). B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. J Immunol 172:3620-3627.

Pabst O, Zweigerdt R, Arnold HH (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.

Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Pálinkás L, Szabó M, Berta G, Sétáló G Jr, Németh P, Berki T (2009). Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. Int Immunol 21:1269-1276.

Taylor PR, Pickering MC, Kosco-Vilbois MH, Walport MJ, Botto M, Gordon S, Martinez-Pomares L (2002). The follicular dendritic cell restricted epitope, FDC-M2, is complement C4; localization of immune complexes in mouse tissues. Eur J Immunol 32:1888-1896.

Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L (2005). The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. Trends Immunol 26:104-110.

van Rooijen N, van Nieuwmegen R (1984). Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. Cell Tissue Res 238:355-358.

Zachrau B, Finke D, Kropf K, Gosink HJ, Kirchner H, Goerg S (2004). Antigen localization within the splenic marginal zone restores humoral immune response and IgG class switch in complement C4-deficient mice. Int Immunol 16:1685-1690.

dc_1678_19

Cell Tissue Res (2007) 328:473–486
DOI 10.1007/s00441-007-0378-6

REGULAR ARTICLE

Distinct roles of lymphotoxin-β signaling and the homeodomain transcription factor Nkx2.3 in the ontogeny of endothelial compartments in spleen

Péter Balogh · Mercedesz Balázs · Tamás Czömpöly · Debra S. Weih · Hans-Henning Arnold · Falk Weih

Received: 16 June 2006 / Accepted: 10 January 2007 / Published online: 21 February 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract The formation of peripheral lymphoid tissues is indispensable for the efficient recognition and elimination of external antigens by lymphoid and accessory cells of the adaptive immune system. The spleen is structurally arranged around various vascular beds with distinct endothelial phenotypes. Using immunohistochemistry, we investigated the postnatal developmental characteristics of the marginal sinus and its relationship with various red-pulp sinus subsets. We also determined the importance of the lymphotoxin β receptor (LTβR) and the role of the Nkx2.3 transcription factor for the formation of the splenic vasculature. Both the administration of soluble LTβR-Ig fusion protein to neonates and the deletion of LTβR or downstream signaling components (RelB and p52) of the NF-κB family inhibited the phenotypic maturation of marginal sinus but had no effect on the vascular compartmentalization of the red pulp. The integrity of the marginal sinus and the proper vascular segregation of the red pulp appeared to be controlled by Nkx2.3, as Nkx2.3-deficient mice exhibited an abnormal distribution of IBL-7/1^{hi}/IBL-9/2^{-} sinuses and a lack of IBL-7/1^{lo}/IBL-9/2^{+} vessels. Our data suggest that phenotypic heterogeneity among different vascular elements within distinct anatomical regions of the spleen differentially depends on developmental factors such as lymphotoxin signaling or Nkx2.3, whereas the marginal sinus is controlled by both pathways.

Keywords Spleen · Endothelium · Lymphotoxin/LT · RelB/NF-κB · Nkx2.3 · Mouse (C57Bl/6; C.B-17/Icr *scid*/*scid*)

This work was supported by ETT grant no. 592/2003 from the Ministry of Health, Social and Family Affairs, Hungary (P.B.) and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (F.W. and H.H.A.). P.B. is a recipient of the Széchenyi István Research Fellowship of the Hungarian Academy of Sciences.

P. Balogh (✉) · M. Balázs · T. Czömpöly
Department of Immunology and Biotechnology,
Faculty of Medicine, University of Pécs,
Szigeti út 12.,
H-7624 Pécs, Hungary
e-mail: peter.balogh@aok.pte.hu

D. S. Weih · F. Weih
Fritz Lipmann Institute, Research Group Immunology,
Leibniz Institute for Age Research,
Jena, Germany

H.-H. Arnold
Department of Cell and Molecular Biology,
Institute of Biochemistry & Biotechnology,
Technical University of Braunschweig,
Braunschweig, Germany

Introduction

Despite the considerable structural differences existing between the secondary lymphoid tissues of the adaptive immune system, they share two common features: one is the continuous influx and trafficking of lymphocytes involving specialized vascular elements, and the other is the directed segregation of both their sessile (mesenchymal) and mobile (hemopoietic) cellular constituents (Fu and Chaplin 1999; Cyster 2005). In developing lymph nodes and spleen, a series of complex cellular interactions takes place between immature hemopoietic cells and the precursors of microenvironmental components in which the mobile early-colonizing cells induce the differentiation of various stromal cells (Mebius 2003). In this process, a major role has been established for lymphotoxin β (LTβ) and its receptor (LTβR; Rennert et al. 1996; Gommerman and Browning 2003). The engagement of LTβR by its ligands (LTαβ_2 or LIGHT, which is homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression, and competes

dc_1678_19

with HSV glycoprotein D for HVEM on T cells/TNFSF14) induces a complex signaling event mediated by various elements of the NF-κB pathway (Aggarwal 2003; Schneider et al. 2004). The absence of these components in the spleen leads to a number of lymphoid and stromal structural abnormalities in both the central white pulp (periarteriolar lymphatic sheath [PALS] and follicles) and marginal zone (Weih and Caamano 2003).

The vasculature of the spleen plays an essential role in tissue compartmentalization and in the establishment of immune competence. The white pulp is supplied with blood via the terminal branches of splenic central arterioles. The terminal segments of these vessels end in capillaries. In mice, the capillaries drain into the marginal sinus (MS), and thereafter, the blood flow passes into venous sinuses across the red pulp (Steiniger and Barth 2000). Corresponding to these different anatomic compartments, considerable phenotypic heterogeneity has been established for the various vascular segments in the murine spleen (Balázs et al. 1999, 2001). The close relationship between splenic endothelium and the local control of hemopoiesis is further supported by the identification of SLAM-positive (CD150+, CD244−, CD48−) hemopoietic stem cells in close association with the endothelium of red-pulp sinuses in adult mice (Kiel et al. 2005). This observation also indicates an intimate local ontogenic connection between various hemopoietic cells and their endothelial neighbors, emphasizing the importance of these widely neglected sessile stromal cells.

In mice, the MS forms the boundary between the central white pulp and the marginal zone compartments of the spleen. A characteristic marker in mice for the MS is the mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) glycoprotein (Kraal et al. 1995). The absence of LTβ signaling is manifested in the lack or rapid loss of the MAdCAM-1 antigen, thus providing a valuable tissue parameter for MS integrity (Mackay et al. 1997). Its immediate neighboring cells include specialized B cells and macrophages that are involved in the rapid reaction against blood-borne antigens and their removal (Mebius et al. 2004). This segment of the vasculature is thought to be the site for the extravasation of recirculating lymphocytes in the spleen, although the precise cellular and molecular components of this process are still controversial.

In addition to the role of the LTβ/NF-κB axis in controlling the expression of the MAdCAM-1 antigen, the homeodomain (HD) transcription factor Nkx2.3 has also been suggested to control MAdCAM-1 expression (Pabst et al. 2000; Wang et al. 2000a,b). Mice with ablated Nkx2.3 HD lack Peyer's patches and have a substantially reduced spleen, with histological abnormalities closely resembling those found in various forms of LT deficiency. In addition to the severely disturbed central white pulp (manifested as a lack of polarized follicles and T/B segregation), these mice have no organized marginal zone, including the absence of MZ macrophages, B cells and MAdCAM-1 expression by sinus-lining cells. However, in a contrast to deficiencies related to the LT pathway, the lymph nodes in Nkx2.3-deficient animals are indistinguishable from normal controls, and in the absence of the Nkx2.3 HD, follicular dendritic cells (FDC) can still develop, even though their distribution in the spleen is abnormal (Tarlinton et al. 2003).

Our previous studies with monoclonal antibodies (mAbs) raised against endothelium subsets have established that the splenic endothelium in mice is heterogeneous in terms of membrane antigen expression and developmental kinetics, both in the white pulp and in red-pulp microvascular segments (Balázs et al. 2001). In this work, we have sought to determine the relationship between the expression pattern of these regional phenotypic markers and that of MAdCAM-1. Furthermore, we have investigated the role of various components acting within the TNF/LT pathway and the Nkx2.3 HD transcription factor in the formation of distinct vascular compartments of the spleen. We have found that the regulatory functions of the LT pathway and the Nkx2.3 HD are spatially restricted in different fashions. Our observations suggest that the formation of some sinus elements in the red pulp is mainly controlled by Nkx2.3 and is unaffected by LTβR function, whereas the complex composition of cells lining the marginal sinus appears to be regulated by both LTβR and Nkx2.3 activities.

Materials and methods

Mice Wild-type C57Bl/6 and C.B-17/Icr *scid/scid* (SCID) mice were obtained from Charles-River Hungary and housed under specific pathogen-free (SPF) conditions. Mice deficient for LTβR, RelB, NF-κB1/p50, NF-κB2/p52 (Weih et al. 2001; Fütterer et al. 1998; on a B6 background and kept at the SPF facility of the Forschungszentrum Karlsruhe, Institute of Toxicology and Genetics) and Nkx2.3 (Pabst et al. 2000; on a mixed B6×129 genetic background and kept at the Technical University of Braunschweig, Department of Cell and Molecular Biology, Institute for Biochemistry and Biotechnology) were used. Heterozygous littermates were employed as controls. Mice were genotyped for the Nkx2.3 mutant allele by polymerase chain reaction (PCR) with primers corresponding to the second exon of the Nkx2.3 gene (Nkx2.3-37, 5′-GCGGGA GACTGTAAGACGAG-3′; Nkx2.3-256, 5′-TTATCCTG CCGCTGTCTCTT-3; amplicon size: 238 bp) and to the neomycin resistance cassette (sense: 5′-GTCGATCAGGAT GATCTGGAC-3′; antisense: 5′-AAGGCGATAGAAGGC GATGC-3′; amplicon size: 321 bp) with the following cycling profile: 95°C for 3 min, 35 cycles of 94°C for 45 s, 55°C for 30 s, 72°C for 1 min and a final extension at 72°C

dc_1678_19

for 10 min. PCR products were sequenced on an ABI3100 Avant Genetic Analyzer. The newborn C57Bl/6 pups were kept and treated in accordance to the guidelines set out by the Committee on Animal Experimentation of the University of Pécs.

mAbs and reagents mAbs IBL-7/1, IBL-7/22 and IBL-9/2 against distinct endothelial subsets (Balázs et al. 1999, 2001) and ER-TR7 anti-fibroblast (van Vliet et al. 1984) rat mAbs were used as hybridoma supernatants. Anti-CD31 mAb (clone MEC13.3) and biotinylated anti-MAdCAM-1 (clone MECA-367) mAbs were obtained from BD Pharmingen (Calif.), and the anti-mouse IgM mAb (clone LO-MM-9) was from Serotec (Kidlington, UK). For immunofluorescence, unlabeled rat immunoglobulins were detected by using affinity-purified and mouse Ig-adsorbed goat anti-rat IgG antibody conjugated with Alexa-488 (Molecular Probes, Ore.), whereas the biotinylated anti-MAdCAM-1 mAb was visualized by using streptavidin-phycoerythrin conjugate (BD Pharmingen). For light microscopy, the unlabeled primary rat mAbs were detected with biotinylated mouse anti-rat κ-chain mAb (clone MRK-1) and were developed by using extravidin-alkaline phosphatase or streptavidin-horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich, Budapest).

Inhibition of LTβR by soluble receptor analog and anti-LTβ mAb Newborn wild-type mice were treated with a single intraperitoneal injection of 50 μg soluble LTβR-Ig fusion protein dissolved in phosphate-buffered saline (PBS; Mackay et al. 1997) or hamster mAb against LTβ (clone BBF6) at various time points after birth. Normal human or hamster serum IgG at the same dose was used as control.

Immunohistochemistry and immunofluorescence Sections of frozen spleen (7–10 μm thick) were mounted on poly-L-lysine-treated slides and fixed with cold acetone. Sections were dried, blocked with 10% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 20 min, and processed for immunohistochemistry by using biotin amplification and streptavidin-alkaline phosphatase as described (Balázs et al. 2001) or streptavidin-peroxidase with 3-amino-9-ethylcarbasole and H_2O_2 as the substrate.

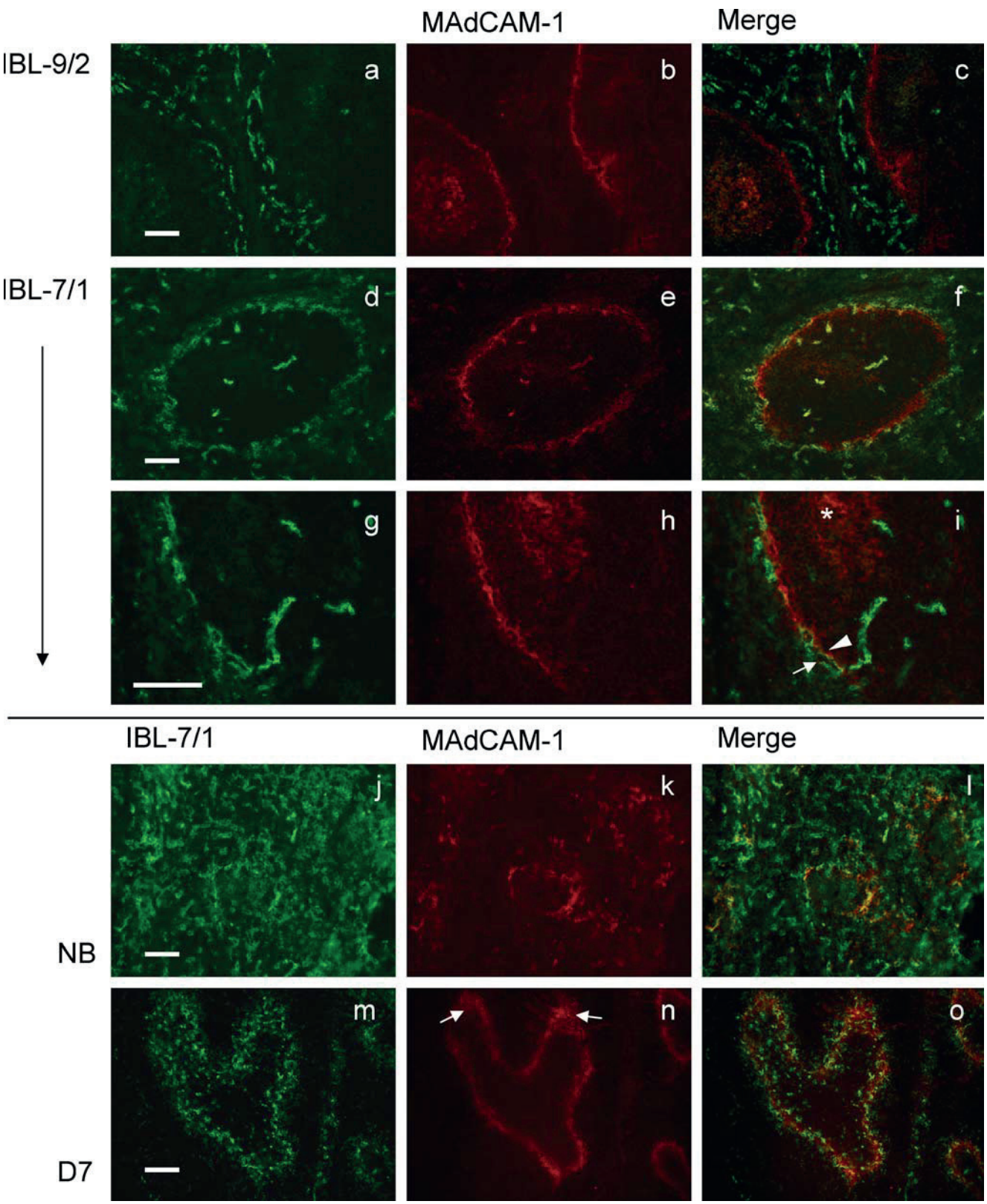
For dual-label immunofluorescent reactions, sections were blocked with BSA, and rat immunoglobulin (anti-CD31, IBL-7/1, or IBL-9/2) was revealed with goat anti-rat IgG conjugated with Alexa-488 dye. After a rinse, the remaining binding sites of the secondary antibodies were saturated with 1:20 dilutions of normal rat serum in PBS, followed by the addition of biotinylated anti-endothelium (against MAdCAM-1 or CD31) mAb for 45 min. Biotinylated antibody was developed by using streptavidin-phycoerythrine. Normal rat IgG or biotinylated rat IgG purified from pooled serum on Protein G affinity columns was used as a staining control. The immunofluorescent and immunohistochemical samples were viewed under an Olympus BX61 microscope equipped with a charge-coupled device camera and AnalySIS software.

Results

Topographic and ontogenic relationship between distinct endothelium subsets and MAdCAM-1 positive elements of marginal sinus

Our previous work established the extensive phenotypic heterogeneity between the endothelia of various vascular segments of the murine splenic circulatory system (Balázs et al. 1999, 2001). Subsequent analyses indicated that, in addition to the differences between endothelia in continuous (central arteriole-type) vessels in the white pulp and in red-pulp venous sinuses, the sinus network of the latter segment could be resolved into at least two complementary groups based on their different reactivities with IBL-7/1 and IBL-9/2 mAbs (IBL-7/1^{hi}/IBL-9/2^{-} and IBL-7/1^{lo}/IBL-9/2^{+} subsets, respectively) and other features including selective labeling with amino-modified albumin and the display of hyaluronan-receptor stabilin-2 (Balogh and Petz 2005). To determine the relationship between these distinct sinus elements and the MS, dual immunofluorescence was employed in conjunction with MAdCAM-1 tissue labeling (Fig. 1). We found that the IBL-7/1^{lo}/IBL-9/2^{+} segments were positioned deep into the red pulp with respect to the MAdCAM-1-positive MS-lining cells (Fig. 1a–c). On the other hand, a considerable fraction of the complementary IBL-7/1^{hi}/IBL-9/2^{-} vessels was placed in close vicinity to the MAdCAM-1-positive region (Fig. 1d–f). These observations supported our previous findings of the local arrangement of both cell populations in relationship to marginal zone-associated macrophages (MOMA-1-positive metallophilic macrophages and ER-TR9-positive marginal zone macrophages, respectively), which were positioned on both sides of the MAdCAM-1-positive marginal sinus (Balázs et al. 2001). The proximity between the IBL-7/1^{hi}/IBL-9/2^{-} vessels and MAdCAM-1-positive MS was sometimes detectable as an immediate juxtaposition of the luminal IBL-7/1-positive and abluminal MAdCAM-1-positive elements at one side of the MS (usually immediately beneath the IBL-7/1-positive layer), whereas the opposing aspect of the sinus lumen was devoid of MAdCAM-1 staining (Fig. 1g–i). As the near-continuous ring-like appearance of MAdCAM-1-positive elements could not inconceivably be attributed to the lining of a single vascular structure, the focal microheterogeneity in this vessel segment indicated that, as in humans (Steiniger et al.

dc_1678_19


MAdCAM-1
Merge
IBL-9/2
a
b
c
IBL-7/1
d
e
f
g
h
*
i
IBL-7/1
MAdCAM-1
Merge
NB
j
k
l
m
n
o
D7

dc_1678_19

◀ **Fig. 1** Spatial relationship of various red-pulp sinus subsets to the marginal sinus. Adult spleen cryosections were stained with sinus endothelium subset-specific antibodies as indicated (*green*) and correlated with the position of MS-lining cells displaying MAdCAM-1 (*red*). *Right* Merged image of the same fields shown *middle* and *left*. The moderate MAdCAM-1 expression within the white pulp encircled by *red* fluorescent labeling indicates follicular dendritic cells (*asterisk* in **i**). The oblique section of MS in **i** shows two different types of sinus wall composition: the red-pulp proximal aspect (*arrow*) is lined by an IBL-7/1-positive segment, whereas the opposing (white-pulp proximal) aspect contains an IBL-7/1-positive endothelial layer positioned directly onto MAdCAM-1-only positive cells (*arrowhead*). Early postnatal development (*NB*, **j**–**l**; *D7*, **m**–**o**) of MS indicates gradual clustering of its IBL-7/1-positive and MAdCAM-1-positive components. Scattered IBL-7/1-positive cells gradually group around the discontinuous rim composed of MAdCAM-1-positive cells, which display focal expansion at some segments surrounding the developing white pulp (*arrows* in **n**). Results are representative of at least four different samples from three independent analyses. *Bars* 100 μm

2001), a substantial part of the MAdCAM-1 antigen in the adult mouse spleen was expressed by non-endothelial cells supplementing the IBL-7/1-positive endothelium subset in forming the MS-lining, as proposed previously (Tanaka et al. 1996).

Next, we explored the relative topology of IBL-7/1-positive and MAdCAM-1-positive elements during the early postnatal period. In newborns, a few elongated MAdCAM-1-expressing cells appeared in clusters intermingled with IBL-7/1-positive cells (Fig. 1j–l). By the end of the first postnatal week, MAdCAM-1-positive cells formed a nearly continuous circular layer of 30–140 μm in thickness; this was frequently traversed by IBL-7/1-positive capillaries connecting the developing red and white pulp (Fig. 1m–o). By the third postnatal week, MAdCAM-1-positive cells established an adult-type pattern comprising a ring of approximately 20–50 μm in thickness intercepted by the IBL-7/1-positive compartment (data not shown).

Inhibition of LTβR in neonates: developmental arrest of the marginal sinus without interference with red-pulp sinus differentiation

The expression of MAdCAM-1 antigen in adult mice has been demonstrated to be particularly sensitive both to transient blockade and genetic ablation of LTβR function (Rennert et al. 1996; Mackay et al. 1997). The close topographic arrangement between the IBL-7/1-positive and MAdCAM-1-positive cells in the developing spleen prompted us to investigate the effect of inhibiting the activity of LTβR by a soluble receptor analog (Fig. 2). A single intraperitoneal administration of 50 μg LTβR-Ig soluble receptor to newborn mice resulted in the severe inhibition of subset-specific IBL-7/1 and pan-endothelium/fibroblast marker IBL-7/22 expression on sinus-lining cells by postnatal day 10 (Fig. 2a–d). B cell colonization of the spleen was also disturbed, as B220-positive cells were restricted to the immediate vicinity of (central) arterioles (not shown). On the other hand, there was no apparent difference in the vascular pattern of the red pulp when using these antibodies, including the appearance of the IBL-7/1$^+$ red-pulp sinus subset, indicating that the inhibitory effect for its expression in the MS was region-restricted (Fig. 2c,d). Moreover, the treatment did not induce ectopic expression of the IBL-9/2 marker around the peripheral part of the white pulp (Fig. 2e,f). In addition to the lack of several endothelium-associated antigens from the MS, neonatal injection with LTβR-Ig also resulted in poor reticular fibroblastic compartmentalization of the white pulp as assessed by its IBL-7/22 reactivity (Fig. 2a,b). Furthermore, LTβR-Ig treatment affected the formation of the MS, but not its maintenance, as this complete block of maturation was not observed in animals that were treated after 2 weeks of age, even when a higher dose of inhibitor protein was applied (not shown).

In addition to LTαβ_2, LIGHT can also bind to LTβR, and both ligands exert largely overlapping functions in the formation of peripheral lymphoid tissues (Wang et al. 2002). To investigate the role of LTαβ_2 in spleen vascular development, we treated newborn mice with a neutralizing mAb against LTβ. The inhibitory effect on MS integrity was indistinguishable from that of LTβR-Ig decoy fusion protein, suggesting that LTβ was likely to be the main, if not the exclusive, LTβR ligand in this process (data not shown).

Because of a mutation affecting the early differentiation events of T and B cells, SCID mice have a rudimentarily developed lymphoid stromal structure. When analyzed for their vascular architecture, both MAdCAM-1 and the distinct IBL-7/1 markers were present in the marginal zone area of these mutant mice (Fig. 2h,i,k), indicating that antigen-receptor-bearing T or B cells were not essential for this pathway, and other hemopoietic cells (such as NK and myeloid lineages) appeared to be sufficient to provide the morphogenic signals required for MS vessel formation in these mutants. However, these non-T-non-B hemopoietic cells could only poorly induce the compartmentalization of IBL-7/22-positive reticular meshwork, as manifested by the focal paucity of IBL-7/22 mAb reactivity within the white pulp (Fig. 2g). The IBL-9/2-reactive red-pulp sinus subset showed a normal distribution (for comparison see Figs. 1, 3m–o).

Distinct roles of the RelB, p50, and p52 members of the NF-κB family in marginal sinus formation

Once engaged by its ligand(s), LTβR induces the activation of various components of the NF-κB transcription factor family. Previous work has established the major and diverse role of RelB and p52 members in the formation of splenic architecture (Poljak et al. 1999; Weih et al. 2001; Weih and Caamano 2003). This prompted us to compare immunohis-

dc_1678_19

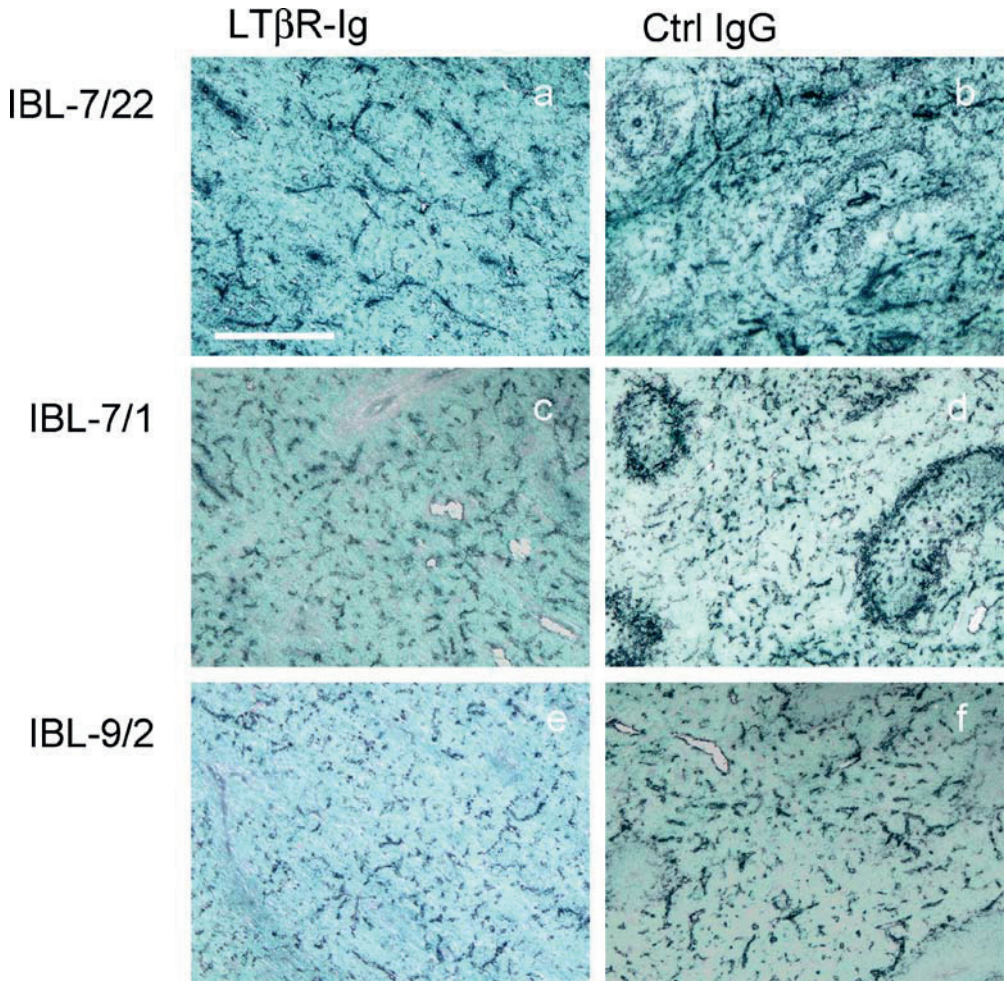


Fig. 2 Regional effects of LTβR blockade and SCID mutation on the topography of the vasculature of the spleen. Newborn mice treated with LTβR-Ig (**a**, **c**, **e**) or control (*Ctrl*) human IgG (**b**, **d**, **f**) were tested for their vascular tissue architecture at postnatal day 10 with the markers indicated. In the decoy-receptor-treated group, there was no indication of the formation of white pulp (evidenced as the absence of reticular meshwork formation in **a** compared with the control group in **b**) as shwon by IBL-7/22 reactivity or the clustering of IBL-7/1-positive elements at the MS area (**d**). The pattern of red-pulp vasculature (delineated with IBL-9/2 mAb against the more numerous red-pulp sinus segments) displayed no noticeable difference between the two groups (**e**, **f**). In 6-week-old SCID mice, the architecture of the MS included a poorly segregated reticular fibroblast meshwork with a focal paucity of reticular staining with IBL-7/22 within the white pulp (*arrow* in **g**) and slightly broadened MAdCAM-1 expression (*arrows* in **h**) with narrow IBL-7/1 MS labeling (**i**) in adjacent sections. The IBL-9/2-reactive elements of the red-pulp sinus appeared to be positioned normally (**j**). In **k**, the enlarged MAdCAM-1-positive ring (*red*) was traversed by IBL-7/1-positive vessels (*green*) connecting the MS area and the white pulp (*arrowhead*) with focal co-localization (*arrow*). Results are representative of at least four different samples from three independent analyses (**a**–**j**, NBT/BCIP development for AP-detection). *Bars* 100 μm

tochemical data of the vascular organization in spleens of mice carrying targeted deletions of these factors with those from LTβR-deficient mutants, and in mice treated with LTβR-Ig fusion protein or with neutralizing anti-LTβ monoclonal antibody (Fig. 3). The most severe tissue alteration was observed in LTβR and RelB mutants in which the MS failed to react with both IBL-7/1 and IBL-7/22 mAbs (Fig. 3a,b,d,e), and MAdCAM-1 expression (not shown) was lacking, as previously reported (Weih et al. 2001). Moreover, in these mutants, the T-cell-zone-associated reticular reactivity with IBL-7/22 mAb appeared as diffuse labeling of the entire white pulp. The defects were slightly less severe in p52-deficient animals in which the MS reacted normally to the IBL-7/1 mAb, whereas IBL-7/22 labeling was absent compared with wild-type controls (Fig. 3j,k). Lack of p52 also resulted in diffuse reticular immunostaining of the white pulp with IBL-7/22 mAb, with an increased intensity of labeling (Fig. 3k). In mice carrying a p50 gene disruption, no effects on the development of the splenic vascular were apparent, except for the faint reactivity of the reticular meshwork within the white pulp with IBL-7/22 mAb (Fig. 3g–i), as assessed by IBL-7/1 and IBL-9/2 immunoreactivity. None of the NF-κB mutations had any effect on the presence of various components of the red-pulp

dc_1678_19

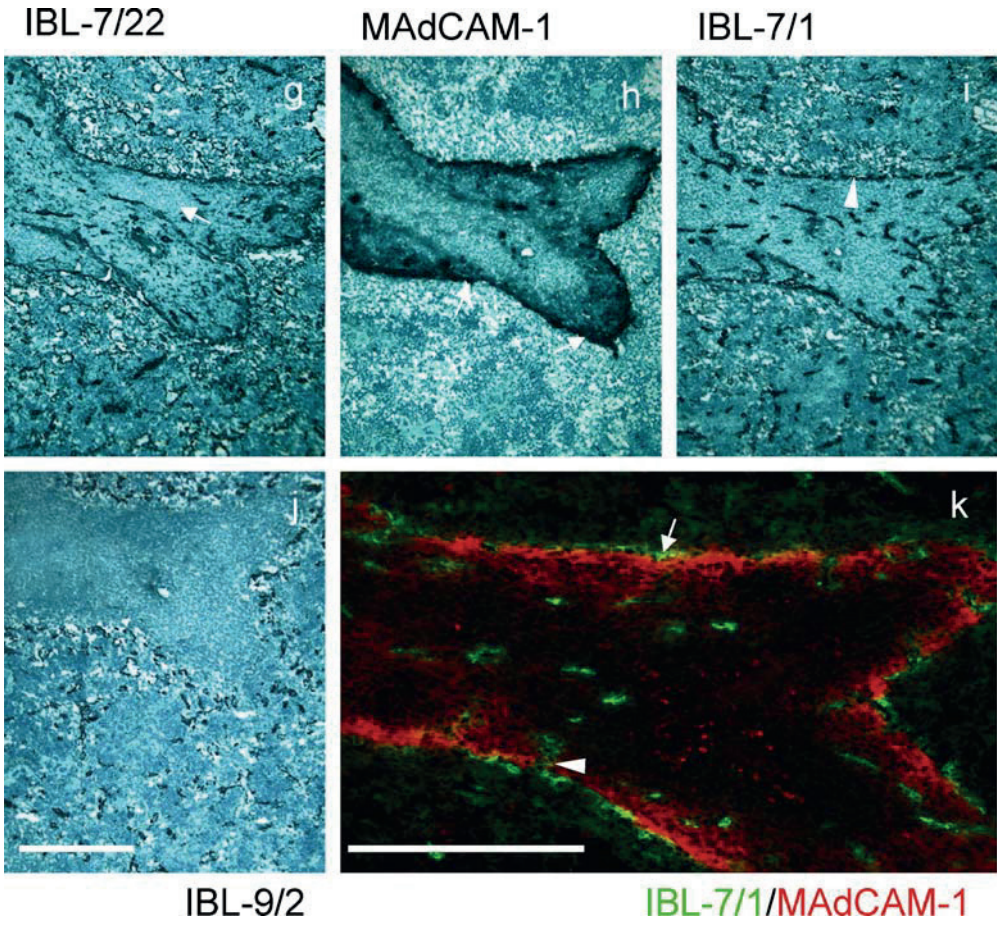


Fig. 2 (continued)

sinus network, in agreement with the observations made with LTβR-Ig and neutralizing anti-LTβ mAb, although the labeling intensity of IBL-9/2 in p50 and p52 mutants appeared more pronounced.

Nkx2.3 deficiency: severe atrophy of the red-pulp sinus network

NKX2.3 and *NKX2.5* are two vertebrate homologs of *tinman*, a homeobox gene belonging to a family of HD-containing transcription factors with diverse developmental functions that involve neural tissues and several abdominal-visceral organs (Price et al. 1992; Evans et al. 1995; Pabst et al. 1998; Qiu et al. 1998; Sussel et al. 1998). Nkx2.3 has been demonstrated to be able to activate MAdCAM-1 promoter in vitro (Pabst et al. 2000). The absence of a differentiated MS and marginal zone (manifested as the lack of MAdCAM-1-positive MS and the absence of marginal zone B cells and specialized marginal zone macrophages, respectively) and the defective T/B compartmentalization in the white pulp of *nkx*$^{-/-}$ mice are similar to those in LTβR-deficient mice. However, CD35-positive mature FDC can still readily be observed (although somewhat misplaced) in B-cell-rich regions of mice in the absence of *NKX2.3* (Tarlinton et al. 2003).

Unlike LTβR-deficiency, the lack of Nkx2.3 HD often resulted in markedly reduced spleen size; in mutants, the organ frequently appeared as a thin pale tissue with patchy red pulp located in a zone along the edge of the tissue, with no B-cell follicle or marginal zone being formed (Fig. 4a,b). The stromal defects in white pulp of Nkx2.3-deficient mice included the absence of reticular compartmentalization as revealed by IBL-7/22 staining (Fig. 4e,f). The vascular abnormalities involved the marginal sinus, manifested as the lack of MAdCAM-1 expression (not shown) and IBL-7/1 reactivity (Fig. 4c–f), and the red pulp. In normal mice, the majority of red pulp sinuses can be identified as IBL-9/2 positive vessels, which only dimly stain with IBL-7/1 mAb (Balázs et al. 2001). In young adult Nkx2.3-deficient mice, these structures were virtually absent (Fig. 4g,h). Only a few, tightly grouped, IBL-9/2^{+} cells with reduced labeling intensity were detectable, whereas the distinct IBL-7/1^{hi}/IBL-9/2^{-} red-pulp vessels were difficult to discern. The disturbed formation of the various red-pulp sinus subsets was evident even in newborn Nkx2.3-deficient mice (Fig. 4i–l). Here, most of the IBL-7/1^{hi} sinuses that, in normal mice, were distributed evenly (for

dc_1678_19

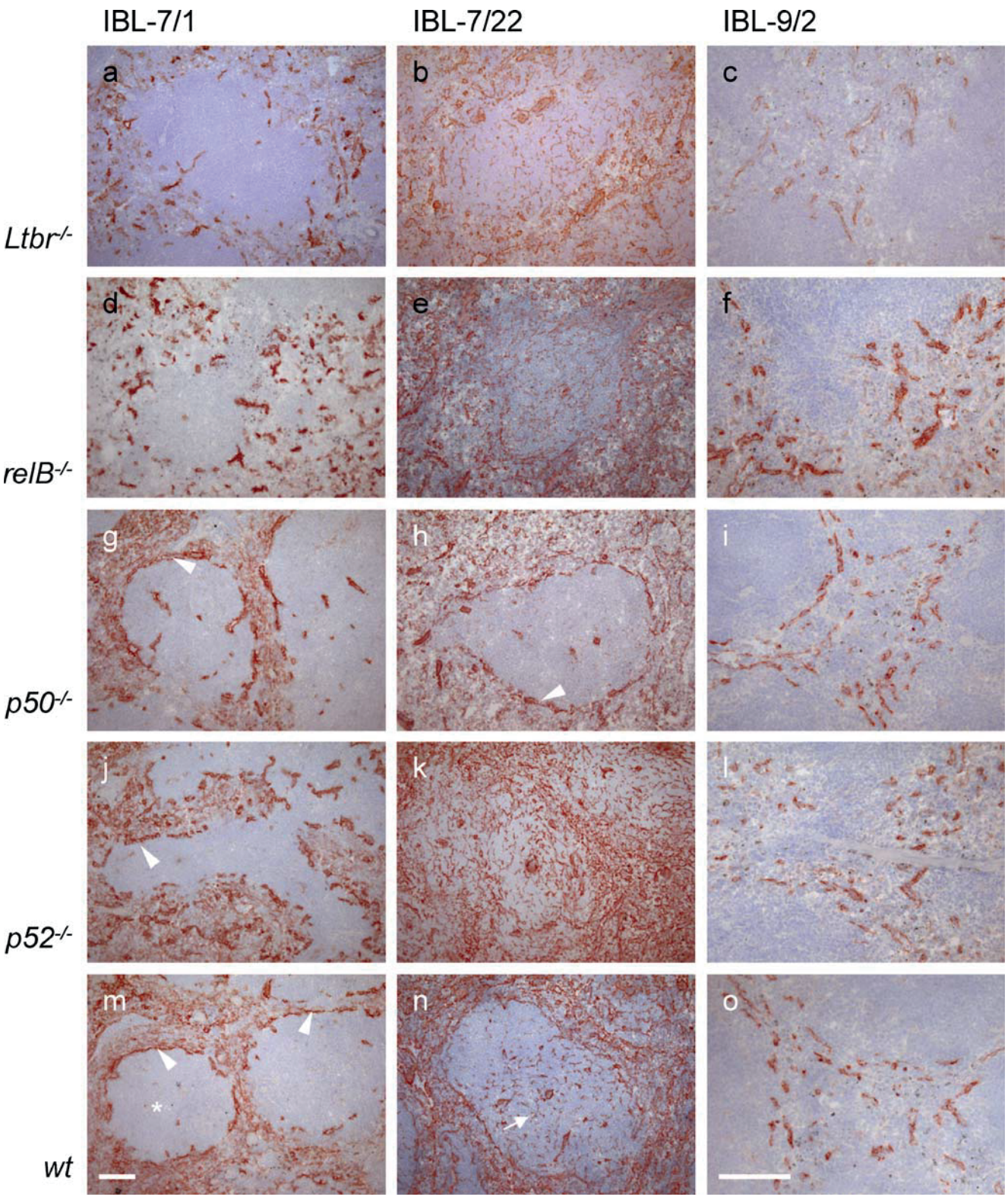


Fig. 3 Vascular topography of spleen in mice with various mutations affecting LTβR signaling. Spleen sections from various mutant mice (indicated *far left*) were reacted with IBL-7/1 (*left*), IBL-7/22 (*middle*) or IBL-9/2 (*right*) mAbs and compared with control samples (*wt*, *bottom*). The marginal sinuses in samples with $p50^{-/-}$ or $p52^{-/-}$ mutations and in *wt* controls are indicated by *arrowheads*. Note the position of the central arteriole (*asterisk*) in *wt* with IBL-7/1 staining (*left*), and the reticular meshwork enriched around the central arteriole (*arrow*) in *wt* with IBL-7/22 labeling (*middle*). Results are representative of at least three different samples (AEC/H_2O_2 development for peroxidase detection). *Bars* 100 μm

dc_1678_19

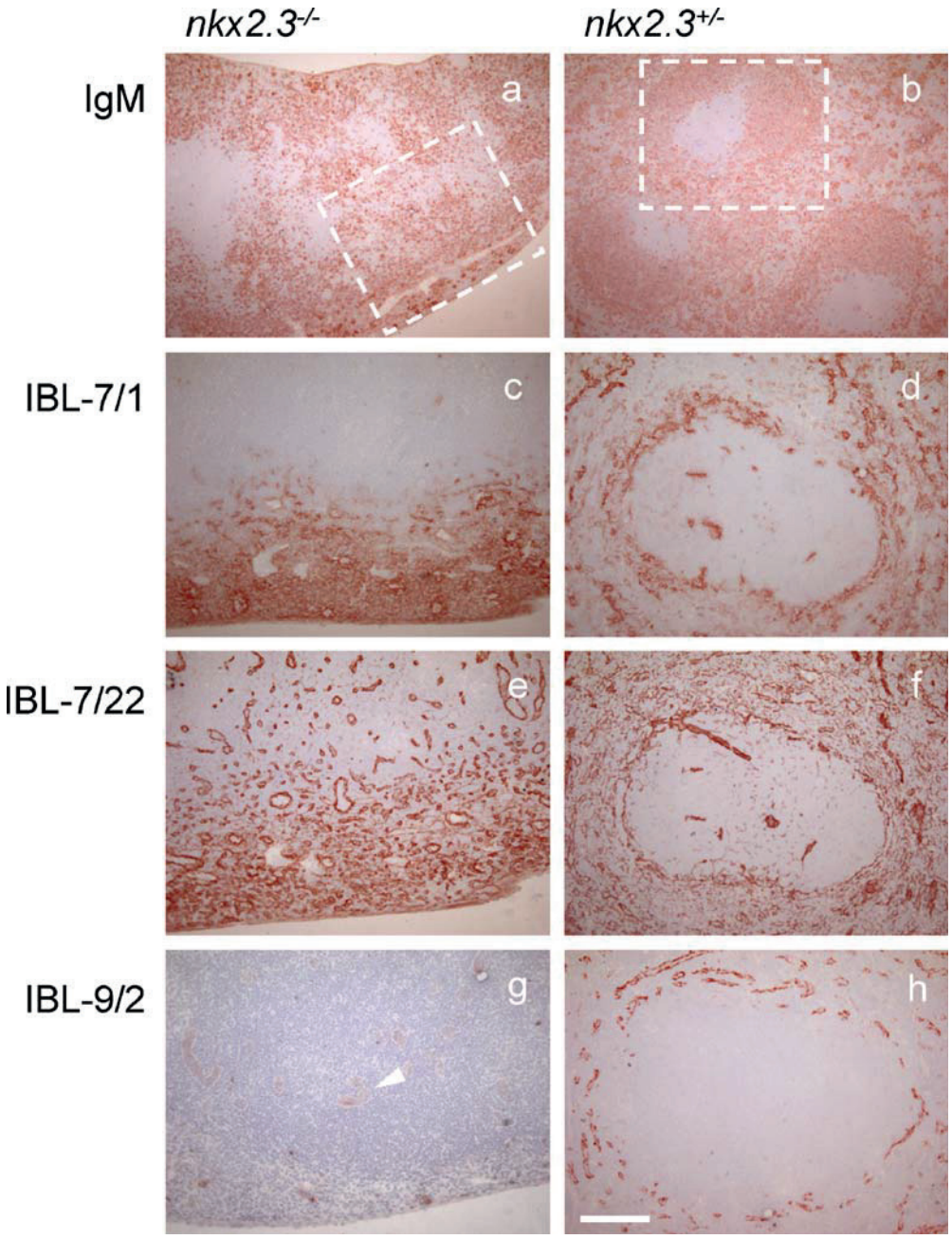


Fig. 4 Disruption of marginal sinus and red-pulp vascular development in Nkx2.3$^{-/-}$ mice. **a–h** Spleen sections from 6– to 8-week-old homozygous (Nkx2.3$^{-/-}$) and heterozygous (Nkx2.3$^{-/+}$) mice were stained with mAbs as indicated *far left*. IgM labeling (**a**, **b**) was used to compare general tissue organization; the area corresponding to the *rectangles* is shown to illustrate endothelial topography. The MS (identifiable by both IBL-7/1 and IBL-7/22 mAbs) is absent in the mutant samples (**c**–**f**), in addition to the poor fibroblastic compartmentalization of the central region of the white pulp revealed by the IBL-7/22 mAb (**e**, **f**). Moreover, the red-pulp sinus subset with IBL-9/2-positive endothelia are barely detectable in these mutants; only a few clusters composed of IBL-9/2-positive cells (*arrowhead*) are visible (**g**, **h**). *Bar* 100 μm. **i–l** The subcapsular accumulation of IBL-7/1-positive sinuses can be observed in the spleen of neonatal (younger than 1 day) Nkx2.3$_{-/-}$ mice. The fibroblastic scaffolding (revealed with ER-TR7 staining; **i**) exhibits no discernible structural organization. The vessels with endothelia expressing CD31 are distributed homogeneously across the tissue (**j**), whereas the red-pulp sinuses with IBL-7/1-positive vessels (even in the absence of separate white pulp) are mainly stacked at the periphery of the tissue (**k**). The red-pulp sinus subset reactive with IBL-9/2 mAb is absent (**l**). Results are representative of at least four different samples from three independent analyses (**a**–**h**, AEC/H_2O_2 development for PO-detection; **i**–**l**, NBT/BCIP development for AP-detection). *Bar* 100 μm

dc_1678_19

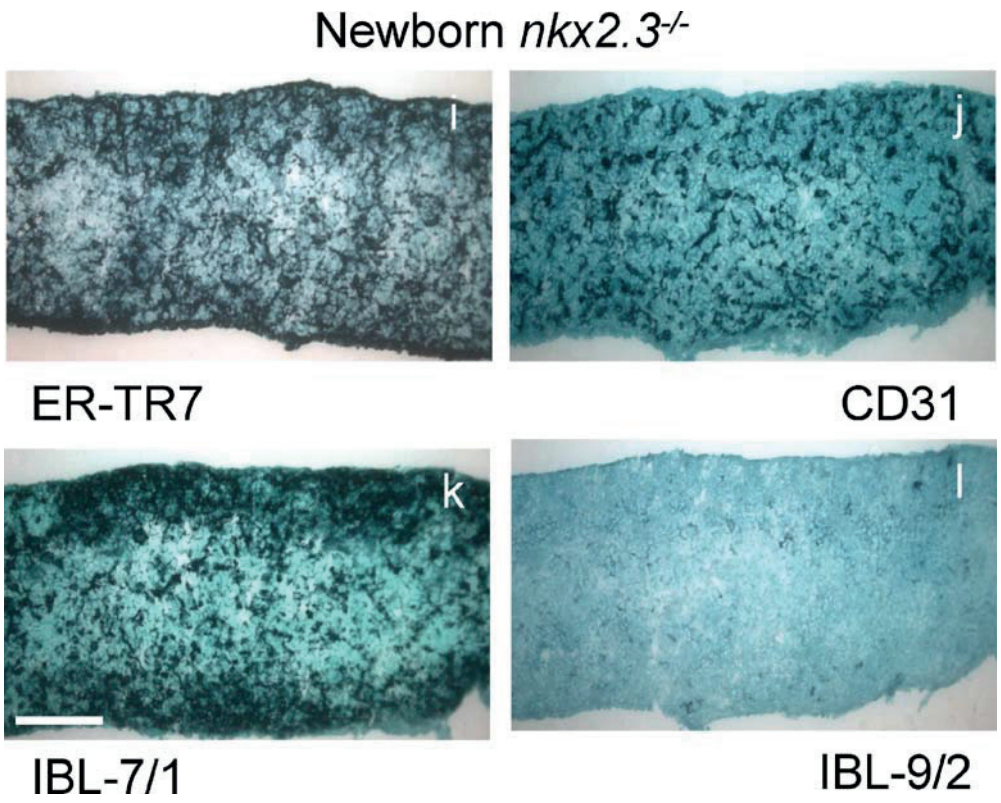


Fig. 4 (continued)

a comparison see Fig. 1j) were now compressed along the peripheral region of the tissue underneath the splenic capsule (Fig. 4k). Furthermore, in contrast to normal mice that exhibited an extensive IBL-9/2-positive sinus network after birth (Balázs et al. 2001), neonatal Nkx2.3 mice virtually lacked these structures (Fig. 4l).

The consequences of various deficiencies on the phenotype of distinct splenic vascular regions are summarized in Table 1.

Discussion

Our findings establish considerable complexity in the developmental regulation of the splenic vasculature and identify two distinct mechanisms that shape the endothelial architecture of this organ in a region-restricted manner, involving both overlapping and distinct elements.

Previous studies aimed at the vascular stromal effect of LTβR inhibition have identified impaired MS formation by

Table 1 Vascular phenotype of mice with various forms of splenic architectural defects (*nb* newborn)

Mutation or treatment	Marginal sinus			Red-pulp sinuses			Compartmentalization of IBL-7/22 meshwork in the white pulp
	IBL-7/1	IBL-7/22	IBL-9/2	IBL-7/1	IBL-7/22	IBL-9/2	
LTβR −/−	–	–	–	+	+	+	–
RelB −/−	–	–	–	+	+	+	–
p52 −/−	+	–	–	+	+	+	–[a]
p50 −/−	+	+	–	+	+	+	+[b]
Nkx2.3 −/−	–	–	–	++	+	–	–
LTβR-Ig (nb)	–	–	–	+	+	+	–
Anti-LTβ mAb (nb)	–	–	–	+	+	+	–
LTβR-Ig (adult)	+/–[c]	+	–	+	+	+	+/–[c]
SCID	+	+	–	+	+	+	+/–
Wild-type	+	+	–	+	+	+	+

[a] Increased staining intensity without T/B-zone compartmentalization
[b] Faint staining with IBL-7/22 mAb
[c] Noticeable alterations occurred only after repeated administration of decoy receptor

dc_1678_19

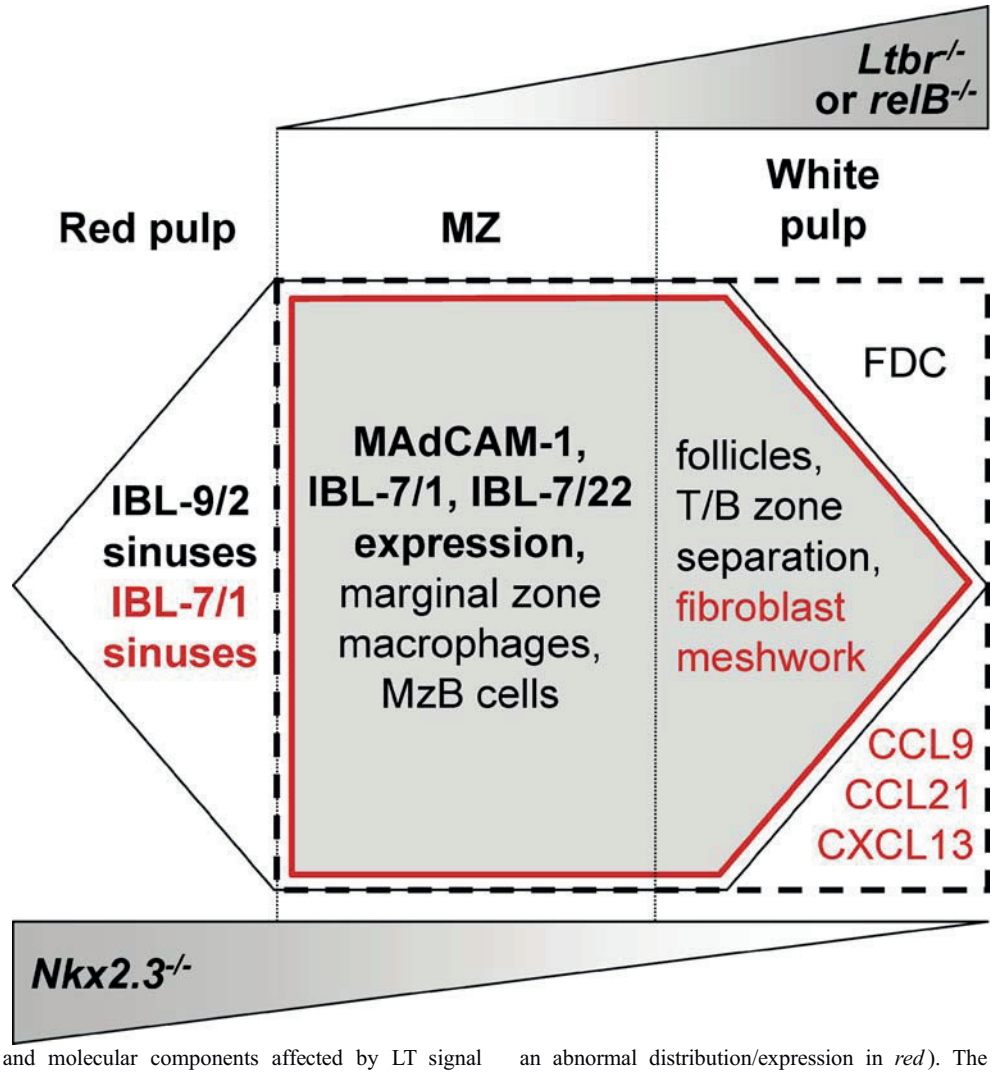


Fig. 5 Cellular and molecular components affected by LT signal inhibition or Nkx2.3 deficiency in the vascular development of spleen. The set of phenotypic characteristics in mice with Nkx2.3 deficiency are grouped in the *hexagonal area*, according to their anatomical location (indicated *top*), with a gradual reduction of severity toward the central white pulp. The inhibition of LTβR signaling (transient or elicited by genetic ablation of one of its components) results in tissue abnormalities but with cells in an opposing direction being affected (clustered within the *rectangular area* delineated with a *dashed line*; components absent in either mutation are indicated in *black*, those with an abnormal distribution/expression in *red*). The cluster of shared features is shown within the *gray area* enclosed by the *red line*. Within the white pulp, the absence of Nkx2.3 does not affect the formation of follicular dendritic cells and the production of homeostatic chemokines (the latter two conditions resulting from impaired LTβR function), whereas the blockade of LTβR signaling does not influence the red-pulp vascular development, which is severely impaired in Nkx2.3$^{-/-}$ mice. In the marginal zone (*MZ*), both forms of deficiencies elicit the same abnormal tissue architecture. Vascular effects are indicated in *bold*

the analysis of the MAdCAM-1 antigen displayed by MS-lining cells. The ring-like appearance of MAdCAM-1 encircling the white pulp suggests its display (at least partly) by non-endothelial cells arranged in a rim, such as fibroblasts expressing L1 glycoprotein or other undefined reticular cells (Tanaka et al. 1996) that are expanded in animals deficient for sphingosine-1-phosphate 3 (Wang et al. 2000a,b; Girkontaite et al. 2004). In addition, the lack of Tie2-driven expression of a green-fluorescent-protein reporter gene in this area also raises the possibility of non-typical endothelial derivation of MS-lining cells (Grayson et al. 2003). Therefore, the shared expression of the IBL-7/1 antigen both on MS-lining cells and on other vascular elements in the red pulp has the benefit of allowing the analysis of the region-specific regulation of the same marker in different splenic compartments. According to our results, the display of the IBL-7/1 marker by MS-lining cells is severely blocked in LTβR- or RelB-deficient animals, as for MAdCAM-1; on the other hand, its red-pulp-associated expression is preserved. Moreover, the distribution of the complementary IBL-9/2-positive red-pulp vessels is indistinguishable from the wild-type controls in any LT-related deficiency, arguing for LT-independence with respect to vascular development in this region. As is the case for other

dc_1678_19

stromal tissue elements within the spleen, such as FDCs and white-pulp fibroblasts (Balogh et al. 2001, 2004), the first 7–10 postnatal days are of crucial importance for the maturation of vascular architecture (Balázs et al. 2001), because the inactivation of LTβR by soluble analog in this period leads to a complete arrest of endothelial maturation of the MS. However, once established, the expression of IBL-7/1 marker by MS-lining cells is markedly less sensitive than that for MAdCAM-1, because the same treatment of adult mice does not induce its loss, unlike that of MAdCAM-1. Therefore, the sustained expression of these two surface molecules at the same splenic microanatomic region appears to be regulated differently. Exposure of a (non-MS-derived) murine endothelial cell line to $LT\alpha_3$ in vitro results in the upregulation of a number of adhesion molecules (Cuff et al. 1998), including MAdCAM-1, indicating its inducible regulation. The absence of this molecule in the red pulp can thus be reconciled with the relative paucity of LT expression in red pulp as shown by in situ hybridization (Browning and French 2002). The expression of MAdCAM-1 (Gonzalez et al. 1998) and IBL-7/1 antigens (present description) on the MS in SCID mice indicates an important difference from *rag1*$^{-/-}$ mice in which MAdCAM-1 is absent (Crowley et al. 1999). However, the capacity of SCID for the proper compartmentalization of white-pulp reticular meshwork is compromised, although not as severely as in mice deficient for LTβR. The reason is not yet known as to why the two closely related, yet distinct, mutations in SCID or *rag1*$^{-/-}$ mice that affect the primary differentiation of lymphoid cells translate into such differences between the structural abnormalities of their peripheral lymphoid organs.

Another finding that supports the complex maturational pathway of MS architecture is the discrepancy between the MS endothelium phenotype in *relB*$^{-/-}$ and *p52*$^{-/-}$ mice. In RelB deficiency (similarly to the absence of LTβR), the MS lacks both IBL-7/1 and IBL-7/22 markers (in addition to the lack of MAdCAM-1; Weih et al. 2001) and is coupled with deficient compartmentalization of the fibroblastic meshwork in the white pulp. In contrast, in *p52*$^{-/-}$ mice, the MS preserves its IBL-7/1 expression but lacks both the IBL-7/22 marker and MAdCAM-1 glycoprotein, whereas the reticular display of the IBL-7/22 antigen is stronger, yet without proper compartmentalization. Therefore, RelB appears to regulate both the maturation of the MS endothelium and the formation of the fibroblastic network, whereas for p52, the primary target may thus be the fibroblastic cells, and p52 may influence the development of MS endothelium less strongly, perhaps indirectly. This interpretation can also be reconciled with the possibility that some MAdCAM-1-positive elements of the MS-lining cells (absent in both *relB*$^{-/-}$ and *p52*$^{-/-}$ mice) are of non-endothelial origin.

The deficiency of Nkx2.3 presents a unique pattern of endothelial disorganization. The near-complete absence of the IBL-9/2^{+} red-pulp sinus subset and the occurrence of IBL-7/1^{+} vessels stacked at the subcapsular area of the spleen indicate a dramatic rearrangement of red-pulp vasculature in these mice. In addition to the spleen, the absence of Nkx2.3 affects Peyer's patches and, less severely, mesenteric lymph nodes, whereas peripheral lymph nodes are intact (Pabst et al. 2000; Wang et al. 2000a,b).

The severely perturbed differentiation of red-pulp and MS vascular elements raises the issue of potential Nkx2.3 target genes in addition to that for MAdCAM-1. In embryos, Nkx2.3 is expressed throughout the mesenchyma of the developing spleen, until subsequent hemopoietic colonization followed by blood cell expansion induces its scattered expression. More recently, some members of the NKX family involved in splenic mesenchymal differentiation (Bapx1/Nkx3.2 and Hox11) have been found to be regulated by the Pbx1 protein of the TALE HD family; this effect appears to be instrumental in the early formation of the splenic anlage (Brendolan et al. 2005). Whether, at a later stage of organ development, Pbx1 also influences the expression of Nkx2.3, thus being involved in the guidance of the formation of spleen's vasculature, remains unknown. The hemopoietic colonization of developing spleen before birth is accompanied by a rapid decline in Nkx2.3 expression, suggesting that the Nkx2.3-mediated commitment along various red-pulp sinus subsets is completed before adult-type tissue architecture is established (Wang et al. 2000a,b).

In summary, we conclude that the "gradient" of affected vascular tissue compartments in LTβ/LTβR/RelB mutation and Nkx2.3 deficiency moves in two opposing directions, taking the central regions of the white pulp as a reference (Fig. 5). In an "outward reduction" fashion and in the absence of LTβR signaling, the effect heavily accumulates within the white pulp (PALS, follicles and marginal zone), with no detectable alteration of the red-pulp sinus architecture. In contrast, the bulk of structural abnormalities in Nkx2.3$^{-/-}$ mice along the "inward reduction" gradient affect both the red pulp (leading to its severe atrophy and perturbed vascular network) and the marginal zone (including both its endothelial and sessile macrophage and B cell populations). The organization of the central white-pulp stroma appears moderately disrupted (manifested as the diffuse staining pattern of reticular fibroblasts in follicles and PALS with IBL-7/22 mAb). The way that these regulatory circuits interact in the stromal differentiation of the spleen remains to be clarified.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge the expert contribution of Ms. Judit Melczer who maintained the hybridoma cells. The LTβR-Ig decoy receptor and the anti-LTβ hamster mAb

dc_1678_19

were kindly provided by Dr. Jeffrey L. Browning (Biogen), and the ER-TR7 mAb was generously supplied by Dr. Willem van Ewijk (Leiden University Medial Center, The Netherlands).

References

Aggarwal BB (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol 3:745–756

Balázs M, Grama L, Balogh P (1999) Detection of phenotypic heterogeneity within the murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies IBL-7/1 and IBL-7/22. Hybridoma 18:177–182

Balázs M, Horváth G, Grama L, Balogh P (2001) Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. Cell Immunol 212:126–137

Balogh P, Petz A (2005) Selective binding of biotinylated albumin to the lymphoid microvasculature. Histochem Cell Biol 123:357–363

Balogh P, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK (2001) Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. Cell Immunol 214:45–53

Balogh P, Horváth G, Szakal AK (2004) Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. J Histochem Cytochem 52:1287–1298

Brendolan A, Ferretti E, Salsi V, Moses K, Quaggin S, Blasi F, Cleary ML, Selleri L (2005) A Pbx1-dependent genetic and transcriptional network regulates spleen ontogeny. Development 132:3113–3126

Browning JL, French LE (2002) Visualization of lymphotoxin-beta and lymphotoxin-beta receptor expression in mouse embryos. J Immunol 168:5079–5087

Crowley MT, Reilly CR, Lo D (1999) Influence of lymphocytes on the presence and organization of dendritic cell subsets in the spleen. J Immunol 163:4894–4900

Cuff CA, Schwartz J, Bergman CM, Russell KS, Bender JR, Ruddle NH (1998) Lymphotoxin alpha3 induces chemokines and adhesion molecules: insight into the role of LT alpha in inflammation and lymphoid organ development. J Immunol 161:6853–6860

Cyster JG (2005) Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. Annu Rev Immunol 23:127–159

Evans SM, Yan W, Murillo MP, Ponce J, Papalopulu N (1995) *Tinman*, a *Drosophila* homeobox gene required for heart and visceral mesoderm specification, may be represented by a family of genes in vertebrates: XNkx-2.3, a second vertebrate homologue of tinman. Development 121:3889–3899

Fu YX, Chaplin DD (1999) Development and maturation of secondary lymphoid tissues. Annu Rev Immunol 17:399–433

Fütterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K (1998) The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. Immunity 9:59–70

Girkontaite I, Sakk V, Wagner M, Borggrafe T, Tedford K, Chun J, Fischer KD (2004) The sphingosine-1-phosphate (S1P) lysophospholipid receptor S1P3 regulates MAdCAM-1+ endothelial cells in splenic marginal sinus organization. J Exp Med 200:1491–1501

Gommerman JL, Browning JL (2003) Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. Nat Rev Immunol 3:642–655

Gonzalez M, Mackay F, Browning JL, Kosco-Vilbois MH, Noelle RJ (1998) The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. J Exp Med 187:997–1007

Grayson MH, Hotchkiss RS, Karl IE, Holtzman MJ, Chaplin DD (2003) Intravital microscopy comparing T lymphocyte trafficking to the spleen and the mesenteric lymph node. Am J Physiol Heart Circ Physiol 284:H2213–H2226

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell 121:1109–1121

Kraal G, Schornagel K, Streeter PR, Holzmann B, Butcher EC (1995) Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in the spleen. Am J Pathol 147:763–771

Mackay F, Majeau GR, Lawton P, Hochman PS, Browning JL (1997) Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice. Eur J Immunol 27:2033–2042

Mebius RE (2003) Organogenesis of lymphoid tissues. Nat Rev Immunol 3:292–303

Mebius RE, Nolte MA, Kraal G (2004) Development and function of the splenic marginal zone. Crit Rev Immunol 24:449–464

Pabst O, Herbrand H, Arnold HH (1998) Nkx2-9 is a novel homeobox transcription factor which demarcates ventral domains in the developing mouse CNS. Mech Dev 73:85–93

Pabst O, Forster R, Lipp M, Engel H, Arnold HH (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

Poljak L, Carlson L, Cunningham K, Kosco-Vilbois MH, Siebenlist U (1999) Distinct activities of p52/NF-kappa B required for proper secondary lymphoid organ microarchitecture: functions enhanced by Bcl-3. J Immunol 163:6581–6588

Price M, Lazzaro D, Pohl T, Mattei MG, Ruther U, Olivo JC, Duboule D, Di Lauro R (1992) Regional expression of the homeobox gene Nkx-2.2 in the developing mammalian forebrain. Neuron 8:241–255

Qiu M, Shimamura K, Sussel L, Chen S, Rubinstein JL (1998) Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression relative to other Nkx genes during vertebrate CNS development. Mech Dev 72:77–88

Rennert PD, Browning JL, Mebius R, Mackay F, Hochman PS (1996) Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. J Exp Med 184:1999–2006

Schneider K, Potter KG, Ware CF (2004) Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. Immunol Rev 202:49–66

Steiniger B, Barth P (2000) Microanatomy and function of the spleen. Series: Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, vol 151. Springer, Heidelberg

Steiniger B, Barth P, Hellinger A (2001) The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp: do fibroblasts guide lymphocyte immigration? Am J Pathol 159:501–512

Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JLR, German MS (1998) Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. Development 125:2213–2221

Tanaka H, Habata Y, Saito S, Fukushima O, Miyasaka M (1996) Phenotypic characteristics and significance of reticular meshwork surrounding splenic white pulp of mice. J Electron Microsc (Tokyo) 45:407–416

Tarlinton D, Light A, Metcalf D, Harvey RP, Robb L (2003) Architectural defects in the spleens of Nkx2-3-deficient mice are intrinsic and associated with defects in both B cell maturation and T cell-dependent immune responses. J Immunol 170:4002–4010

Van Vliet E, Melis M, Ewijk W van (1984) Monoclonal antibodies to stromal cell types of the mouse thymus. Eur J Immunol 14:524–529

Wang CC, Biben C, Robb L, Nassir F, Barnett L, Davidson NO, Koentgen F, Tarlinton D, Harvey RP (2000a) Homeodomain factor Nkx2-3 controls regional expression of leukocyte homing corecep-

dc_1678_19

tor MAdCAM-1 in specialized endothelial cells of the viscera. Dev Biol 224:152–167

Wang SL, Kutche M, DiSciullo G, Schachner M, Bogen SA (2000b) Selective malformation of the splenic white pulp border in L1-deficient mice. J Immunol 165:2465–2473

Wang J, Foster A, Chin R, Yu P, Sun Y, Wang Y, Pfeffer K, Fu YX (2002) The complementation of lymphotoxin deficiency with LIGHT, a newly discovered TNF family member, for the restoration of secondary lymphoid structure and function. Eur J Immunol 32:1969–1979

Weih F, Caamano J (2003) Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. Immunol Rev 195:91–105

Weih DS, Yilmaz ZB, Weih F (2001) Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. J Immunol 167:1909–1919

Transcription Factor Nkx2-3 Controls the Vascular Identity and Lymphocyte Homing in the Spleen

Tamás Czömpöly,* Árpád Lábadi,* Zoltán Kellermayer,* Katalin Olasz,* Hans-Henning Arnold,† and Péter Balogh*

The vasculature in the spleen and peripheral lymph nodes (pLNs) is considerably different, which affects both homing of lymphocytes and antigenic access to these peripheral lymphoid organs. In this paper, we demonstrate that in mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2-3, the spleen develops a pLN-like mRNA expression signature, coupled with the appearance of high endothelial venules (HEVs) that mediate L-selectin–dependent homing of lymphocytes into the mutant spleen. These ectopic HEV-like vessels undergo postnatal maturation and progressively replace MAdCAM-1 by pLN addressin together with the display of CCL21 arrest chemokine in a process that is reminiscent of HEV formation in pLNs. Similarly to pLNs, development of HEV-like vessels in the Nkx2-3–deficient spleen depends on lymphotoxin-β receptor-mediated signaling. The replacement of splenic vessels with a pLN-patterned vasculature impairs the recirculation of adoptively transferred lymphocytes and reduces the uptake of blood-borne pathogens. The Nkx2-3 mutation in BALB/c background causes a particularly disturbed splenic architecture, characterized by the near complete lack of the red pulp, without affecting lymph nodes. Thus, our observations reveal that the organ-specific patterning of splenic vasculature is critically regulated by Nkx2-3, thereby profoundly affecting the lymphocyte homing mechanism and blood filtering capacity of the spleen in a tissue-specific manner. ***The Journal of Immunology*****, 2011, 186: 6981–6989.**

The spleen in mammals is the largest single peripheral lymphoid organ, contributing to both innate and adaptive immune responses against invading pathogens. Its development and tissue architecture are strikingly different from other secondary lymphoid organs, including the peripheral lymph nodes (pLNs) and Peyer's patches. Different lymphoid regions in the spleen are arranged around various vessels. The T cell zone is located around central arterioles, and the marginal zone is adjacent to terminal arterioles in human or marginal sinus in rodents, whereas the red pulp is richly perfused by a sinus network lined by different endothelial subsets (1, 2). In contrast to the leukocyte homing in pLNs and Peyer's patches, the spleen lacks high endothelial venules (HEVs) and requires no L-selectin binding for subsequent leukocyte extravasation (3, 4).

The development of the spleen is initiated by the formation of its mesenchymal anlage, controlled by the concerted action of multiple transcription factors, including Pbx1, Nkx3-2 (also known as Bapx1), TLX1 (formerly known as HOX11), and Nkx2-5 (5, 6). In the absence of any of these factors, development of the spleen is arrested early, resulting in asplenia. TLX1 may be regulated independently by the homeodomain transcription factor Barx1, which is also involved in stomach development (7). Importantly, loss of TLX1 does not prevent the formation of lymph nodes (8). Embryonic lethality of Pbx1- and Nkx2-5–deficient mice and neonatal death of Nkx3-2–null mutants precludes the analysis of their potential roles in lymph node development (9–11).

Following formation of the splenic primordium, spleen progenitor cells undergo expansion and local hematopoiesis starts, controlled by the transcription factor Tal-1 (also known as Scl) (12). Subsequently, $CD4^+/CD3^-/CD45^+/IL\text{-}7R\alpha^+$ lymphoid cells accumulate around the developing blood vessels in close proximity with stromal cells that express MAdCAM-1 and VCAM-1 (13). This close cellular association is thought to be necessary for efficient interaction between members of the TNF/lymphotoxin (LT) family displayed by lymphoid cells (termed lymphoid tissue inducer) and their cognate receptors on stromal cell precursors (14–16). In contrast to the spleen-autonomous defect in TLX1-deficient mutant mouse (8), loss of either LTα or the receptor for LTβ (LTβR) prevents the formation of lymph nodes and Peyer's patches, whereas the spleen develops, although with severely disturbed architecture of white pulp and marginal zone (17). Distinct lymph node and spleen phenotypes elicited in mutants lacking LT ligands or corresponding receptors and in TLX1 mutants suggest that development of the various peripheral lymphoid organs follows distinct regulatory programs. In this process, the factors for cell lineage specification related to vascular patterning in distinct lymphoid organs are mostly unknown.

More recently, the homeobox transcription factor Nkx2-3 has been identified as an important regulator of spleen ontogeny (18–

*Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Faculty of Medicine, H-7624 Pécs, Hungary; and †Department of Cell and Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Biotechnology, Technical University of Braunschweig, 38106 Braunschweig, Germany

Received for publication November 12, 2010. Accepted for publication April 15, 2011.

The work was supported by a research fund from the Faculty of Medicine of the University of Pécs (to P.B.) as well as by "Science Please" Research Team Innovation Grant SROP-4.2.2/08/1/2008-0011 to the University of Pécs (to P.B.). T.C. is a recipient of the Bolyai János Postdoctoral Fellowship of the Hungarian Academy of Sciences. P.B. is supported by the Öveges József Research Fund from the National Office for Research and Technology of Hungary.

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

Abbreviations used in this article: FDC, follicular dendritic cell; HEV, high endothelial venule; KO, knockout; LT, lymphotoxin; LTβR, receptor for lymphotoxin β; mLN, mesenteric lymph node; P0.5, <1-d-old neonates; P10.5, postnatal day 10.5; pLN, peripheral lymph node; PNAd, peripheral lymph node addressin; qPCR, quantitative RT-PCR.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1003770

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

20) without affecting pLN development. The Nkx2-3 transcription factor belongs to the structurally conserved Nk family of 18 members sharing a common DNA recognition sequence. This group of transcription factors is involved in the cell type specification of visceral mesoderm, including heart, lungs, pancreas, and gastrointestinal tract, in a highly complex expression pattern (21). *Nkx2-3*$^{-/-}$ mice lack the marginal sinus and have atrophic red pulp sinus network, two specific vascular structures in the spleen that are absent in other peripheral lymphoid tissues (22). In this paper, we report that Nkx2-3 deficiency in the mouse transforms the vasculature in a mutant spleen structurally and functionally toward the typical vascular pattern of pLNs. The disruption of the Nkx2-3 gene results in the formation of splenic pLN addressin (PNAd)-positive HEVs that display CCL21 arrest chemokine and mediate L-selectin–dependent homing. The development of ectopic HEV-like structures in a mutant spleen requires LTβR-mediated signaling, similar to the HEVs in pLNs. Moreover, the mutants show reduced marginal zone-associated capture of pathogens. Thus, our observations provide evidence that specification of the vascular pattern in the spleen and its consequences for lymphocyte homing are critically dependent on the transcription factor Nkx2-3.

Materials and Methods

Mice

Nkx2-3$^{-/-}$ mice from a 129Sv × B6 mixed background were backcrossed with BALB/c mice (obtained from Charles River Laboratories, Budapest, Hungary) through 14 generations and genotyped as described previously. C57BL/6 and 129Sv Nkx2-3 mutants were maintained at the Technical University of Braunschweig (Braunschweig, Germany). For homing studies, BALB/c mice from the faculty's specific pathogen-free breeding unit were used as a lymphocyte donor for adoptive transfer. LTβR-deficient mice (23) were provided by Drs. K. Pfeffer (Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany) and F. Weih (Leibniz Institute for Age Research, Fritz Lipmann Institute, Jena, Germany). 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 (Pécs, Germany). The double-knockout (KO) mice were identified in the F_2 generation by simultaneous PCR amplification of the *Nkx2-3*, neomycin resistance cassette, and LTβR loci from genomic DNA by using the following primer pairs: *Nkx2-3*, 5′-GCGGGAGACTGTAAGACGAG-3′ (forward) and 5′-TTATCCTGCCGCTGTCTCTT-3′ (reverse), amplicon size: 238 bp; neomycin resistance cassette, 5′-GTCGATCAGGATGATC-TGGAC-3′ (forward) and 5′-AAGGCGATAGAAGGCGATGC-3′ (reverse), amplicon size: 321 bp; and LTβR, 5′-GCATGTAGCCATGAAGACAG-GAT-3′, (forward) and 5′-CGCAAAGACAAACTCGCCTAT-3′ (reverse), amplicon size: 150 bp.

Abs and reagents

Rat mAbs against mouse fibroblastic reticular cell markers (IBL-11) and Thy-1 (IBL-1) were developed in our laboratory (24). For flow cytometry and dual immunohistochemistry, IBL-1 mAb was conjugated with sulfo-*N*-hydroxysuccinimide biotin ester (Sigma-Aldrich, Hungary, Budapest). Rat hybridoma cell lines secreting anti-CD3 (KT-3), anti–MAdCAM-1 (MECA-367), L-selectin/CD62L (MEL-14), and B220 (RA3-6B2) were obtained from the American Type Culture Collection and used either as a hybridoma supernatant or a fluorescein-conjugated reagent. PE-conjugated anti-mouse CD21/35 mAb (clone 7G6), MECA-79 mAb against PNAd, and FITC-labeled and PE-conjugated goat anti-rat IgG were purchased from BD Biosciences (Soft Flow Kft, Pécs, Hungary). Goat Abs against CCL21 and CXCL13 chemokines and NorthernLights 557-conjugated donkey Ab against goat IgG were obtained from R&D Systems (Biomedica Hungary Kft, Budapest, Hungary). Biotinylated rat mAb against mouse IgM was produced in our laboratory from B7.6 clone. Goat anti-mouse IgM–HRP conjugate was produced by Invitrogen (Csertex Kft, Budapest, Hungary). Rabbit Abs against Prox1 were purchased from AngioBio (Del Mar, CA). Affinity-purified rabbit polyclonal Abs against HEC-GlcNAc6ST sulfotransferase (25) were provided by Dr. N. H. Ruddle (Yale University School of Medicine, New Haven, CT) and were detected with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich). Streptavidin-Alexa Fluor 350 and streptavidin-Alexa Fluor 488 conjugates were purchased from Invitrogen. LTβR–Ig fusion protein was provided by Dr. J. L. Browning (Biogen Idec, Cambridge, MA) and was injected in newborn Nkx2-3 KO mice as described previously (26). Pooled human IgG was used as control.

Flow cytometry

Lymphocytes were isolated from the spleen and lymph nodes by teasing apart the organs between the frosted ends of two microscopic slides and filtered through a 70-μm pore-size cell strainer. The cells were incubated with a mixture of fluorescein-labeled anti-B220 and biotinylated anti-CD3 or anti-CD62L mAb in the presence of 2.4G2 anti-CD16/32 mAb. The biotinylated mAbs and the biotinylated cells in homing studies were detected with PE-streptavidin. Dead cells were excluded based on their light scattering properties. At least 20,000 live cells were collected by a BD Biosciences FACSCalibur cytometer and analyzed using the CellQuest software.

Immunohistochemistry and immunofluorescence

The single and dual-label immunofluorescence and immunohistochemical procedures are previously described (24, 26) for control staining normal rat IgG at 10 μg/ml concentration was used. After mounting, the sections were viewed under an Olympus BX61 fluorescent microscope. The acquisition of digital pictures with a charge-coupled device camera was performed using the analySIS software.

Adoptive cell transfer and bacterial injection

Lymphocytes from pLNs or mesenteric lymph nodes (mLNs) were isolated and labeled with CFSE (Invitrogen) or sulfo-*N*-hydroxysuccinimide biotin ester (Sigma-Aldrich) as described previously (27). For lymphocyte homing studies, 200 μl cell suspension at 5×10^7 CFSE-labeled cells was injected i.v. in the tail vein, followed by the removal of the spleen at various intervals. The distribution of labeled cells was tested cells by immunofluorescence using anti-PNAd or IBL-11 mAb against white pulp fibroblasts (24) in conjunction with PE-labeled anti-rat IgG. For competitive homing, two different cellular labeling procedures were used in which the CFSE-labeled cells were subsequently incubated with MEL-14 IgG (purified by Protein G FPLC) or IBL-10 control rat mAb. After washing, the cells were counted and mixed at 1:1 ratio with biotinylated cells as reference population, followed by the i.v. injection of mixed cells. The mice were sacrificed 30 min after the injection, and their distribution of CFSE-labeled and biotinylated lymphocytes in different lymphoid tissues was determined by flow cytometry or immunofluorescence. The CFSE:biotin ratio of the cells in lymphoid organs was calculated following the normalization of labeled cell frequencies with the preinjection CFSE:biotin ratio; thus, the CFSE:biotinylated cell ratio recovered from each organ was divided by the CFSE:biotinylated cell ratio in the preinjection cell mixture. For bacterial capture, mice were i.v. injected with 10× *Escherichia coli* previously conjugated with FITC in 250 μl PBS.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated with the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) and was treated with DNase I (Sigma-Aldrich). cDNA was prepared with the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR primers used for real-time quantitative amplification of Glycam1, Madcam1, B3gnt3, Gcnt1, Chst2, Chst4, and Fut7 were described previously (27). PCR primers for Cd34, endomucin, Cd300lg, podocalyxin-like protein, 18S rRNA, and Hprt1 were designed by Primer Express Software (Applied Biosystems). PCRs were run in triplicates using the Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems) on an ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Standard curves were generated for each transcript, and expression levels were normalized to β-actin; the relative expressions were calculated using β-actin normalized expression levels of wild-type spleens as reference samples.

Statistical analysis

Normal distributions of means were tested with a one-sample Kolmogorov-Smirnov test. Means were compared with one-way ANOVA, followed by a Bonferroni test. A p value < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with SPSS 14.0 software.

Results

Altered expression of marker genes associated with HEV development in the spleen and lymph nodes

Previous studies of *Nkx2-3*$^{-/-}$ mice in our laboratory and elsewhere already revealed a broad range of structural alterations of the spleen (18, 22, 26), affecting the marginal sinus and red pulp sinuses, two highly specific segments of the splenic vasculature

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

involved in splenic recirculation in mice (reviewed in Ref. 2). Despite the lack of these vessels in mutants, the accumulation of lymphocytes in the mutant spleen indicates the existence of a selective homing process to that organ, prompting an analysis of those endothelium-associated genes that have been implicated in tissue-specific homing. Microarray analysis of the Nkx2-3–mutant spleen suggested that expression of several genes associated with endothelium-mediated tissue-specific homing (28–33) was altered (data not shown). In this study, we performed real-time PCR to quantify expression of some of these Nkx2-3–regulated candidate genes in wild-type and mutant spleens as well as in pLNs and mLNs. The analysis demonstrated profound reduction of MAdCAM-1 expression in the spleen of the homozygous mutant mouse in agreement with previous reports (19, 20). Importantly, expression of GlyCAM-1 in the mutant spleen was dramatically upregulated (~10, 000-fold), whereas transcript levels for other marker genes, such as CD34, endomucin, CD300 Ag-like family member G (Cd300lg, also known as nepmucin), and podocalyxin-like protein, were also increased, although to a lesser extent (between 4- and 16-fold) in comparison with wild type (Fig. 1*A*). Particularly, the upregulation of the endothelial marker GlyCAM-1 and the reduction of MAdCAM-1 expression in the mutant spleen appeared more similar to pLNs than in wild-type spleens. In comparison, the pLNs from Nkx2-3–deficient mice showed a slightly elevated expression of MAdCAM-1 and an equal expression of GlyCAM-1 compared with wild-type mice, whereas mLNs had less MAdCAM-1 and a higher level of GlyCAM-1 mRNA expression than wild-type controls. The differences between the expression level of other core proteins genes was less dramatic, although the general tendency was an increased mRNA production for all genes investigated. Pdxl, a lesser investigated PNAd core protein, showed an increased expression in all lymphoid tissues of Nkx2-3 mutants, whereas its expression in mLNs and pLNs of wild-type mice was reduced compared with wild-type spleens.

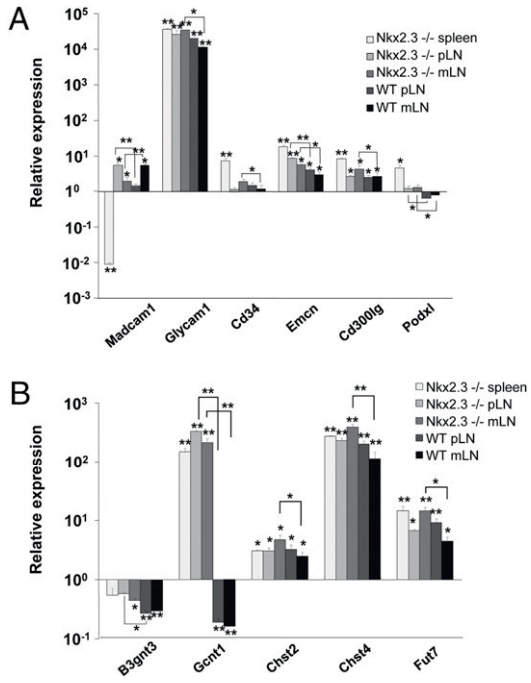


FIGURE 1. qPCR analysis of mRNAs for PNAd core proteins (*A*) and modifying enzymes (*B*) in the Nkx2-3$^{-/-}$ and wild-type (WT) spleens, pLNs, and mLNs. Values in different organs are normalized to the ratio of target mRNA to β-actin in the WT spleen, represented by the line drawn at $y = 1$, and are expressed on a log scale. Bar diagram shows the mean ± SD of six parallel samples from three mice per organ; $*p < 0.05$, $**p < 0.001$.

Both GlyCAM-1 and MAdCAM-1 may serve as backbone proteins for PNAd in a process depending on glycosylation and sulfatation, mediated by the glycosyltransferases B3gnt3 and Gcnt1, the fucosyltransferase Fut7, and the sulfotransferases Chst2 and Chst4, the latter also known as HEC-GlcNAc6ST, respectively (34). Quantitative RT-PCR (qPCR) analysis for these genes in wild-type and mutant spleens revealed that the majority of these transcripts were upregulated in the *Nkx2-3*$^{-/-}$ mutant, although to different degrees (Fig. 1*B*). B3gnt3 glycosyltransferase in Nkx2-3–mutant spleen was expressed at a lower amount compared with wild-type spleen; however, this reduced mRNA transcription was also observed at various degrees in lymph nodes from both mutant and wild-type samples. Gcnt1 glycosyltransferase enzyme mRNA was the only transcript showing differences in expression in lymph nodes between Nkx2-3 mutants and wild-type samples in which, in both pLNs and mLNs of Nkx2-3–mutant mice, mRNA for Gcnt1 glycosyltransferase was expressed at a robustly increased amount, similarly to the mutant spleen. Chst4 sulfotransferase mRNA showed a similar degree of increased expression in the mutant spleen as well as in the pLNs and mLNs from both mutant and wild-type mice. Taken together, these observations suggest that, in the absence of the transcription factor Nkx2-3, endothelial MadCAM-1 expression in the spleen is essentially replaced by GlyCAM-1, and the modifying enzymes required to generate functional PNAd are also upregulated. Thus, this pattern of endothelial marker gene expression in mutant spleens is reminiscent of HEVs in pLNs.

Ectopic formation of HEV-like vessels in the Nkx2-3$^{-/-}$ *mutant spleen*

The pLN-like signature of transcripts for HEV-related genes and the described alterations of the marginal zone and white pulp (19–22, 26) in the *Nkx2-3*–deficient spleen prompted us to investigate the vasculature in more detail by using MECA-79 anti-PNAd (35) and anti–MAdCAM-1 mAbs. In contrast to the wild-type spleen, which never contains HEVs, in the spleens of young adult *Nkx2-3*$^{-/-}$ mice, PNAd-positive HEVs in close proximity of B cell-rich foci were prominently present. Dual immunofluorescence for HEC-GlcNAc6ST sulfotransferase (25) and the PNAd epitope showed coexpression on HEV-like vessels in the mutant spleen, similarly to pLNs from either wild-type or mutant mice (Fig. 2*A*). To test whether ectopic HEVs develop only in BALB/c background, we also tested Nkx2-3 mutants from both 129Sv and C57BL/6 strains. We found that spleen sections from these haplotypes also contained PNAd-positive HEVs (data not shown). These vessels were lined with plump endothelial cells that express CD31 endothelial Ag in which transmigrating lymphocytes could also readily be observed (Fig. 2*A*). It is interesting to note that elevated expression of PNAd on ectopic HEV-like vessels in the Nkx2-3–deficient mouse mutant appeared to be limited to the spleen, because HEVs in Peyer's patches or in mLNs did not show any increased reactivity for this marker (data not shown).

To test whether the PNAd epitope is accessible for recirculating lymphocytes, MECA-79 mAb against PNAd was administered to *Nkx2-3*$^{-/-}$ mutants and wild-type mice i.v. We found a strong luminal binding in mutant spleens to a degree similar to pLNs from either mutant or wild-type mice, demonstrating that this L-selectin ligand is accessible for recirculating lymphocytes in the mutant spleen, similarly to pLNs, whereas wild-type spleens had no discernible reactivity (Fig. 2*B*).

We also found that, unlike Nkx2-3 mouse mutants on other genetic backgrounds (129Sv × B6 [F_1] or C57BL/6), ~75% of

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

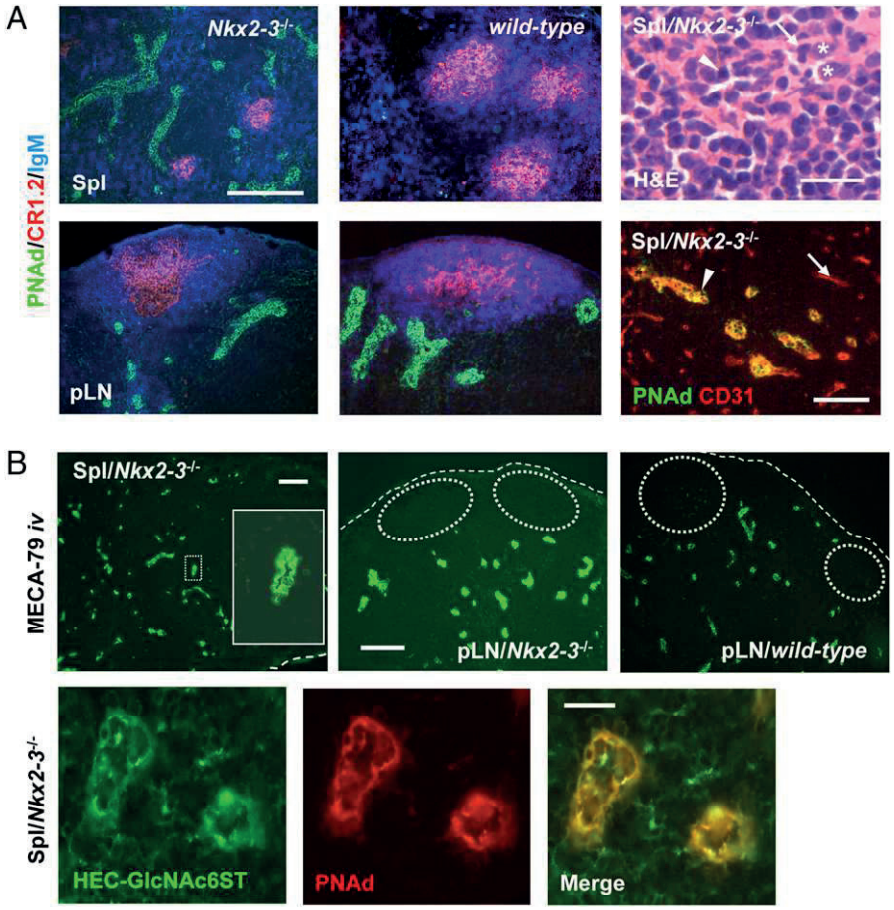


FIGURE 2. Absence of the Nkx2-3 gene in the BALB/c mouse leads to HEV formation and pLN-like lymphocyte composition in the spleen. *A*, Frozen sections of the spleen and pLNs from mutant and wild-type mice were stained with fluorescence-labeled Abs as indicated. The purple color represents the merge of complement receptor (CR) expression by FDCs and IgM reactivity of adjacent B cells. Scale bar, 100 μm. H&E staining (*upper right*) shows plump endothelial cells (asterisks) and lymphocytes either closely associated with (arrowhead) or transmigrating between (arrow) these cells (scale bar, 25 μm). Endothelial cells in the mutant spleen coexpress CD31 and PNAd (*lower right*). Scale bar, 100 μm. *B*, The PNAd epitope is detected at the luminal surface of the endothelium in HEVs in the mutant spleen (*upper left*) and pLNs from mutant (*upper right*) or wild-type (*lower right*) mice following i.v. administration of MECA-79 anti-PNAd mAb without any detectable reactivity in the wild-type spleen (*lower left*). Dashed lines, Edges of tissue; *inset*, higher magnification of the marked rectangular area in *left panel* (60× objective). Ellipses in the pLN sections demarcate follicles. Scale bar, 100 μm. *Lower panels*, PNAd-positive HEVs that strongly coexpress HEC-GlcNAc6ST in the *Nkx2-3*$^{-/-}$ spleen (*lower panel*). Scale bar, 50 μm. The figures are representative from a cohort of three to five mice repeated three times.

homozygous BALB/c mice carrying the Nkx2-3 mutation exhibited spleens with nearly no red pulp or had spleens with macroscopically detectable red pulp only in a segment of the organ (Fig. 3*A*). The lack of MAdCAM-1$^+$ marginal sinus-lining cells or aberrant distribution of topographic markers, including marginal zone-associated sessile macrophages or white pulp-associated fibroblastic cells (20, 22), excluded the precise determination of the distribution of various lymphocyte subpopulations. These "redless" spleens or the spleen segments devoid of red pulp are entirely filled with T and B cells without forming discrete territories (Fig. 3*B*). Thus, the formation of red pulp sinuses seems to be particularly sensitive to the Nkx2-3 mutation in BALB/c mice; however, HEV-like vessels develop in homozygous Nkx2-3 mutants irrespective of the genetic background.

The lymphocyte composition of mutant spleens was tested by flow cytometry. Our analyses revealed a slightly increased proportion of lymphoid cells expressing L-selectin/CD62L homing receptors together with a relative increase of T cells in a mutant spleen in BALB/c background, thus approaching a T/B cell ratio that is more characteristic for pLNs than for the spleen (Fig. 3*D*). Taken together, these observations suggest that both the vasculature and lymphocyte composition in the Nkx2.3-deficient spleen resemble that of peripheral lymph nodes without, however, the typical tissue compartmentalization of pLNs. To test whether the absence of organized follicles is caused by the lack of CXCL13 homeostatic chemokine production by follicular dendritic cells (FDCs), we stained sections with anti-CXCL13 and anti-CD21/35 Abs. We found that, although the FDC network in mutant spleens was considerably more compact compared with wild-type controls (Fig. 2*A*), FDCs showed detectable CXCL13 production, similarly to the wild-type samples (Fig. 3*C*).

Homing of lymphocytes in the Nkx2-3$^{-/-}$ *spleen involves the ectopic HEV-like vessels producing CCL21 and depends on L-selectin/CD62L*

Next, we investigated whether the ectopic PNAd$^+$ vessels formed in the Nkx2-3–mutant spleen function as lymphocyte exit ports. CFSE-labeled lymphocytes isolated from wild-type pLNs or mLNs were injected i.v., and their localization was determined at various times after injection using double immunofluorescence microscopy. Shortly after, injection-labeled lymphocytes were found to be closely associated with PNAd$^+$ HEVs in the spleen of mutant animals, whereas in wild-type spleens, they were located at the marginal zone (Fig. 4*A*). The mutant spleens appeared to receive significantly fewer lymphocytes than the wild-type organ; however, their accumulation within the HEVs in the mutant spleen was almost indistinguishable from pLNs, and by 12 h, the lymphocytes showed the same degree of tissue dispersion as in peripheral lymph nodes (data not shown).

The initial binding of lymphocytes to marginal sinus-lining cells in the spleen occurs independently of L-selectin (2, 3), but in pLNs, binding to HEVs critically requires L-selectin. To determine whether the presence of PNAd$^+$ HEVs in the spleen is coupled with an altered dependence on L-selectin during homing, we performed short-term competitive homing experiments in which wild-type lymphocytes were treated with the specific Ab MEL-14 to block L-selectin (36). This mAb prevents the homing of lymphocytes to pLNs in vivo but does not eliminate the cells (37). Equal numbers of CFSE-labeled lymphocytes treated with MEL-14 mAb and mock-treated biotinylated control cells (27) were then injected into *Nkx2-3*$^{-/-}$ mutant and wild-type recipients. Thirty minutes after the injection, spleen and pLN cells were isolated and subjected to flow cytometry. We observed that the

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

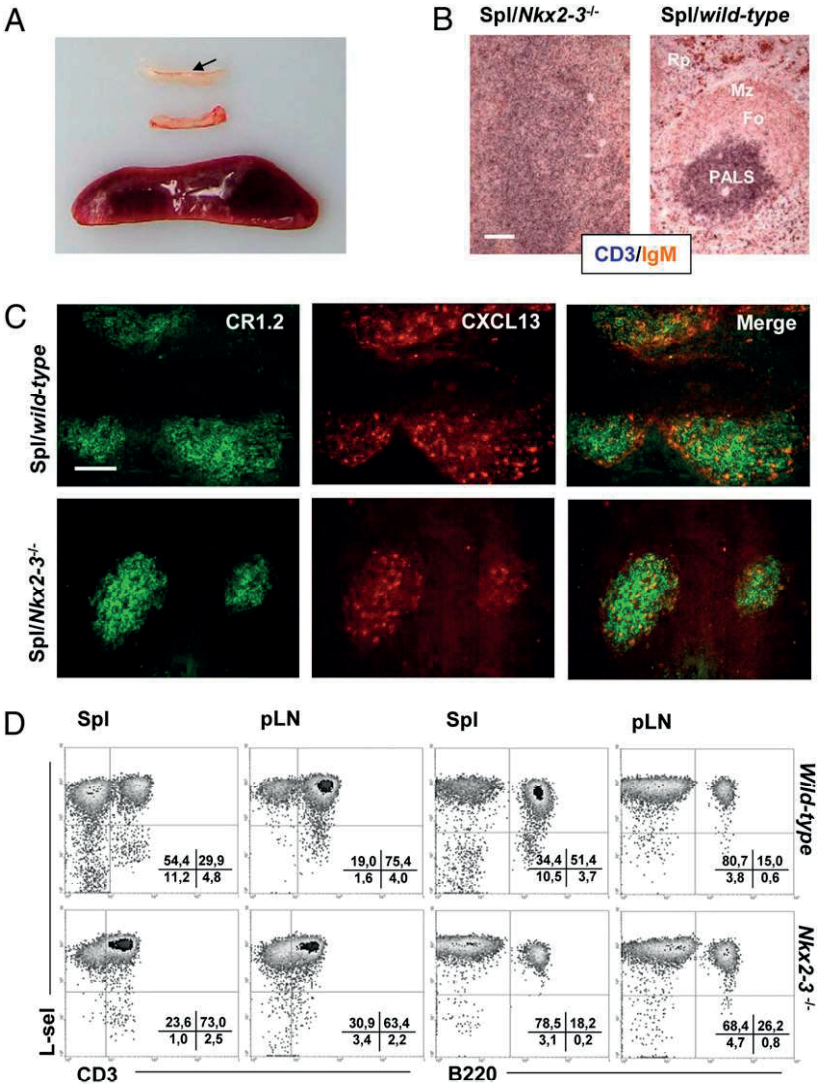


FIGURE 3. Nkx2-3 mutation induces "redless" variant in BALB/c mice. *A*, Macroscopic appearance of "redless" mutant spleen (Spl) (*top* and *middle samples*) in comparison with wild type (*bottom sample*). Arrow points to the splenic hilus. *B*, Frozen sections of young adult spleens from wild-type and *Nkx2-3*$^{-/-}$ mutant mice were immunostained with anti-CD3 and anti-IgM for T and B cells, respectively. Note the mixed cell distribution in the mutant spleen. *C*, Frozen sections of young adult spleens from wild-type and *Nkx2-3*$^{-/-}$ mutant mice were labeled with anti-CR1.2 (*left panels*) and anti-CXCL13 (*middle panels*) Abs to delineate FDCs producing CXCL13 (merge, *right panels*) (n = 5, in two independent experiments). Scale bar, 250 μm. *D*, Flow cytometric analysis of cellular composition in *Nkx2.3*$^{-/-}$ and the wild-type spleen and pLNs. Representative examples illustrate the T-to-B cell ratio and proportion of CD62L (L-sel) expressing lymphocytes in mutant and wild-type control. Numbers indicate the percentages of cells in each quadrant of gated viable lymphocytes. The results are representative for three independent experiments with at least three mice each. Fo, follicle; Mz, marginal zone; PALS, periarteriolar lymphoid sheath; Rp, red pulp.

homing of mock-treated biotinylated lymphocytes in the spleen of *Nkx2-3*$^{-/-}$ mutants was reduced compared with that in wild-type recipients, but more importantly, the homing of MEL-14 mAb-treated CFSE-labeled cells to the mutant spleen was significantly blocked compared with wild-type recipients (Fig. 4*B*). The impaired homing activity of lymphocytes with blocked L-selectin function was indicated by a 3-fold decrease in the CFSE:biotin ratio in the Nkx2.3-deficient spleen but not in the wild-type spleen. The ratio in the mutant spleen was very similar to that in pLNs of wild-type or mutant mice, suggesting that the ectopic PNAd^{+} HEV-like vessels in the mutant spleen use L-selectin for lymphocyte homing. As expected, blocking L-selectin significantly reduces the ratio of CFSE:biotin-labeled cells in both wild-type and mutant pLNs, confirming that lymph nodes use L-selectin–dependent homing mechanism, regardless of the *Nkx2-3* genotype. Interestingly, the biodistribution of variously labeled lymphocytes without MEL-14 blockade also revealed a striking parallel between the mutant spleen and pLNs, because the biotinylation of lymphocytes favored their splenic homing in wild-type mice, whereas in pLNs, the frequency of CFSE cells was higher, resulting in a CFSE:biotin ratio < 1 in the wild-type spleen, and CFSE:biotin ratio > 1 in pLNs as well as in the mutant spleens, respectively.

Subsequent to the binding of L-selectin by PNAd, extravasation of lymphocytes in pLNs involves the arrest chemokine CCL21 that is produced by HEV endothelium (38). To test whether the HEV-like vessels in the mutant spleen also produce CCL21 chemokine, spleen sections were subjected to double immunofluorescence analysis by using anti-CCL21 and MECA-79 Abs. Similarly to pLNs, the majority of PNAd^{hi} vessels in the mutant spleen coexpressed CCL21, which was additionally present on fibroblastic reticular cells. In a normal spleen with no PNAd reactivity, the CCL21 expression was restricted to the central arteriole and fibroblastic reticular cells in the T cell zone (Fig. 4*C*). Thus, the CCL21 chemokine is readily available in ectopic PNAd^{+} vessels in mutant spleens, and it is likely to play a similar role in homing as for the HEVs in pLNs.

Impaired capture of blood-borne pathogens in the spleens of Nkx2-3$^{-/-}$ *mice*

In addition to providing a microenvironment for the initial lodging of mobile lymphocytes during their splenic recirculation, the marginal zone also plays an important role in capturing blood-borne corpuscular Ags, including both encapsulated Gram-positive bacteria and Gram-negative *E. coli* (1). The abnormal vascular arrangement and the reported loss of marginal zone macrophages and a subset of B cells in Nkx2-3–mutant spleens (18–22, 26) prompted us to examine the clearance of bacteria by i.v. injection of fluoresceinated *E. coli* (39). Because of the lack of marginal zone macrophages and MAdCAM-1–positive sinus-lining cells as reference markers in the spleens of mice with

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

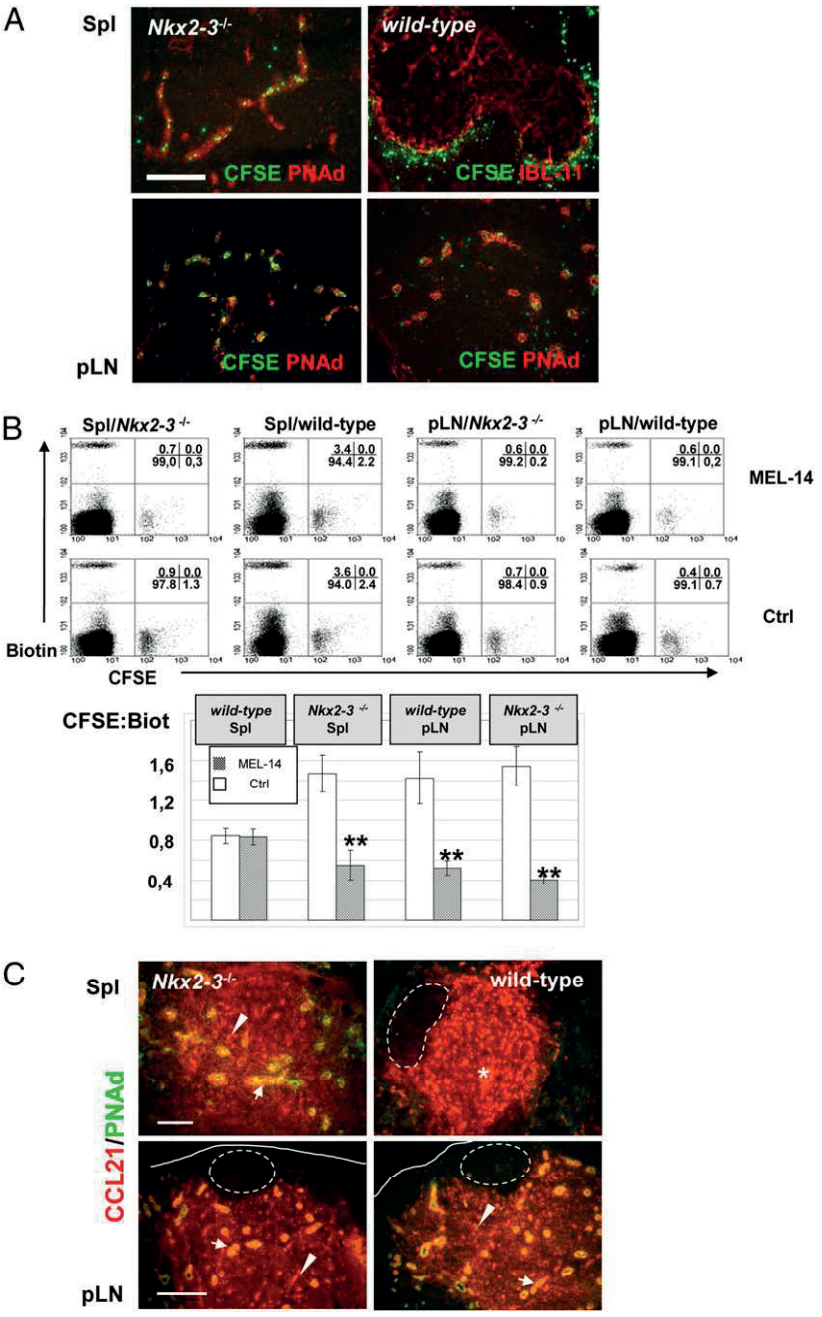


FIGURE 4. HEVs in Nkx2-3$^{-/-}$ mice function as L-selectin–dependent exit ports to the spleen and express CCL21. *A*, CFSE-labeled lymphocytes (green) are localized to HEVs identified with MECA-79 anti-PNAd mAb (red) in the *Nkx2-3*$^{-/-}$ spleen (*left*) and pLN 30 min after i.v. injection. In the wild-type spleen (*right*), the lymphocytes are associated with the marginal zone visualized by IBL-11 mAb. Scale bar, 200 μm; the results are representative for three independent experiments with at least three mice each. *B*, MEL-14 mAb against L-selectin reduces short-term homing to the spleen and pLN in *Nkx2-3*$^{-/-}$ mice. CFSE-labeled cells were treated with MEL-14 mAb or control mAb and injected together with biotinylated cells into wild-type or *Nkx2-3*$^{-/-}$ mutant recipients as described in *Materials and Methods*. Representative examples are shown. Numbers indicate the percentages of cells in the four quadrants. The lower diagram summarizes the results of three independent experiments performed with three to five mice for each genotype. The percentage data of retrieved cells were corrected by the ratio of CFSE:biotinylated cell percentages in the preinjection mixture. Shaded bars, MEL-14 mAb; open bars, control mAb; $^{**}p < 0.001$. *C*, The majority of PNAd^{hi} HEVs (arrows) in both the mutant spleen (*left*) and control pLNs (*middle*) express CCL21 (red and green fluorescence, merged as yellow) in addition to fibroblastic cells (arrowhead), whereas in the normal spleen (*right*), CCL21 expression is overwhelmingly restricted to the T zone fibroblastic reticular cells and central arteriole (asterisk) without detectable PNAd reactivity. Dashed lines demarcate follicles (scale bar, 200 μm; the results are representative for three independent experiments with at least three mice each).

disrupted Nkx2-3, IBL-11 mAb against white pulp fibroblastic reticular cells was used, and IBL-11 mAb detects circumferential reticulum in wild-type mice and perivascular stromal cells in mutants (22, 26). Although efficient retention of bacteria in the marginal zone of wild-type animals was observed, capture of bacteria in the mutant spleens was markedly reduced (Fig. 5). These data indicate that the replacement of splenic marginal sinus and other splenic vessels with ectopic HEVs and the attenuated recirculation of lymphocytes in the Nkx2-3–deficient spleen are accompanied by a considerably reduced capacity to collect blood-borne pathogens, presumably because of the severe reduction of marginal zone macrophages in this mutation (20), which cells are closely associated with the marginal sinus in wild-type mice (1).

Ectopic HEVs in the spleen of the Nkx2-3$^{-/-}$ *mouse develop postnatally and require LTβR activity*

It has been previously reported that in the secondary lymphoid organs of adult *Nkx2-3*$^{-/-}$ mouse MAdCAM-1 is absent, whereas it is still detectable in mLNs of newborn mutants (19, 20). Under physiological conditions, MAdCAM-1 is similarly downregulated during postnatal maturation of HEVs in pLNs (40). In contrast, PNAd^{+} HEVs can also be induced to occur at an ectopic location upon chronic infection coupled with accumulation of lymphoid cells (41). To investigate whether the appearance of ectopic HEVs in a mutant spleen follows the same postnatal developmental kinetics characterized by upregulated PNAd expression in place of MAdCAM-1 as in pLNs, we compared MAdCAM-1 and PNAd expression in mutant mice after birth using immunofluorescence analysis. At P0.5 (<1-d-old neonates), spleens of both *Nkx2-3*–deficient and wild-type mice contained cell clusters expressing MAdCAM-1 but no PNAd (Fig. 6*A*). Significantly, the spleen of the *Nkx2-3*$^{-/-}$ mutant at postnatal day 10.5 (P10.5) exhibited less MAdCAM-1, which was limited to a few dispersed vessels, simultaneously expressing PNAd (Fig. 6*B*). This was in marked contrast to the wild-type spleen at P10.5 in which a considerable

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

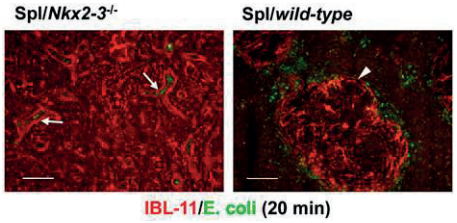


FIGURE 5. Impaired capture of blood-borne pathogens in the Nkx2-3–mutant spleen. A small number of i.v. injected fluoresceinated *E. coli* (green) are retained in the vessels (arrows) in the mutant spleen (*left*), whereas in control mice, a substantial accumulation can be observed in the marginal zone (arrowhead) outlined by IBL-11 mAb (red; scale bar, 500 μm; the results are representative for three independent experiments with at least three mice each).

MAdCAM-1 reactivity was observed in the developing marginal sinus, but absolutely no PNAd-positive cells could be detected at any period. After the second postnatal week, no MAdCAM-1 expression was observed in the mutant spleen, similarly to young adults (19, 20) (data not shown). Comparison of MAdCAM-1 and PNAd expression in the mutant spleen and in normal age-matched pLNs revealed that the kinetics of early postnatal shift of addressin expression were similar in both lymphoid organs (Fig. 6*B*).

The appearance of pLN-like HEVs in Nkx2-3–mutant spleens in a fashion similar to the development of HEVs in pLNs prompted

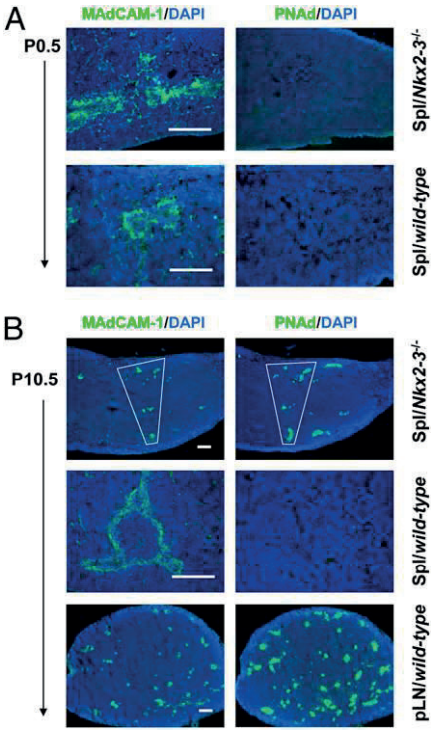


FIGURE 6. pLN-like postnatal switch of addressin expression in splenic HEVs in Nkx2-3–deficient mice. *A*, Frozen newborn (P0.5) mutant and wild-type spleen sections were immunostained as indicated. Nuclei were stained with DAPI (blue). *B*, By postnatal day 10.5 (P10.5), the expression of MAdCAM-1 in the mutant spleen is limited to a few vessels that coexpress PNAd (*top row*, the quadrangle indicates the same area). In the wild-type spleen (*middle row*), MAdCAM-1 outlines the boundary between white and red pulp; PNAd is not expressed. In wild-type pLNs (*bottom row*), most of the HEVs coexpress MAdCAM-1 and PNAd (*left* and *middle panels*). The pictures are representative of three independent experiments performed on three to five mice. Scale bars, 50 μm.

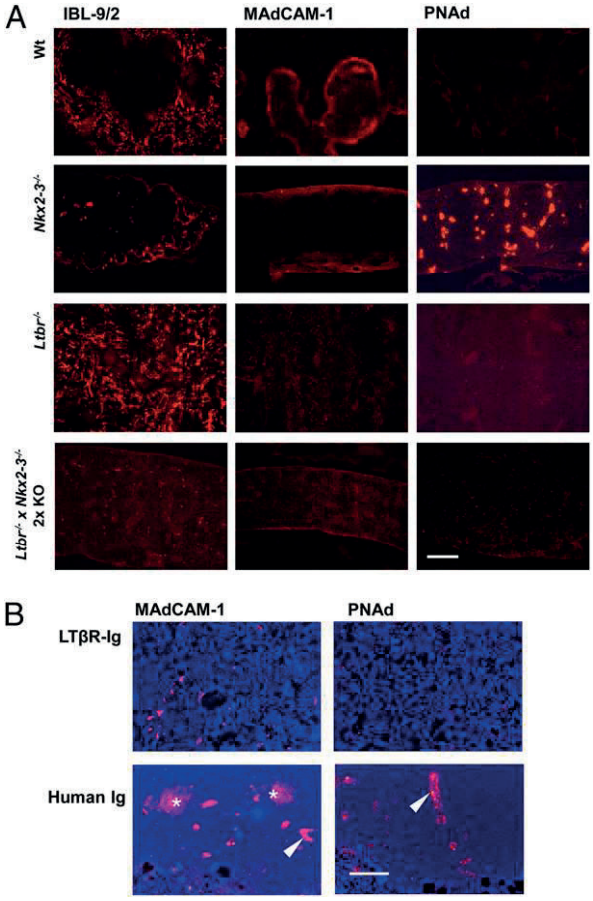


FIGURE 7. The formation of ectopic HEVs requires the activity of LTβR. *A*, Frozen spleen sections from various genotypes from 4-wk-old mice were labeled with the Abs indicated at the top (representative result from staining performed on three separate occasions on three to five mice). Scale bar, 250 μm; $n = 5$. *B*, Postnatal treatment of Nkx2-3–deficient mice with the LTβR-Ig decoy receptor disrupts ectopic HEV formation and abolishes MAdCAM-1 expression (*top row*). HEVs in mice treated with control human IgG (*bottom row*) express both MAdCAM-1 and PNAd (arrowheads) in addition to stroma-associated MAdCAM-1 (asterisk; scale bars, 200 μm; $n = 4$; nuclei counterstained with DAPI).

us to investigate whether this shift of programming is restricted to the vasculature, or other elements in the mesenchymal anlage in mutant spleens also switch to pLN-like features, characterized by their dependence on signaling mediated by LTβR (41, 42). To test whether LTβR signaling influences the development of a spleen in Nkx2-3–mutant mice, we generated double-mutant mice lacking both LTβR and Nkx2-3. These double-KO mice at 4 wk of age entirely failed to display PNAd-positive HEVs in their spleens in addition to lacking IBL-9/2 red pulp vessels (a trait shared with Nkx2-3–deficient mice) and MAdCAM-1 marginal sinus (a feature observed in both parent strains) (Fig. 7*A*). This result suggests that the formation of ectopic HEVs in a mutant spleen is dependent on LTβR function similarly to pLNs; however, as the spleen as a separate organ in these double mutants was present, we conclude that the nonvascular mesenchymal elements of splenic anlage can still develop, in contrast to the pLN formation blocked in the absence of LTβR.

We and others have shown that administration of the LTβR–Ig fusion protein to neonates effectively blocks postnatal vascular development in the murine spleen (26, 43). To test whether the pLN-like programming of splenic vasculature in Nkx2-3 mutants can be modulated postnatally, we applied this decoy receptor to

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

Nkx2-3–deficient mice on P0.5 and P3.5 and harvested spleens on P10.5. We found that postnatal interference with LTβR activity also resulted in a significant reduction of PNAd expression indicative for less ectopic HEVs in the spleen (Fig. 7*B*). Thus, the transformation of splenic vasculature to HEV-like vessels in an Nkx2.3-deficient mouse seems to follow a similar program that underlies vessel formation in pLNs.

Discussion

A common theme in the postnatal organization of structured secondary lymphoid organs is their compartmentalization into discrete regions of T or B cell dominance as a consequence of lymphocyte extravasation from specialized vascular segments. In this study, we provide structural, molecular, and functional evidence that the transcription factor Nkx2-3 plays a key role in determining the vascular identity of the spleen. The spleen in Nkx2-3–deficient mouse acquires pLN-like vessels, which structures mediate L-selectin–dependent homing. These observations suggest an unexpected plasticity among the developmental programs that control the vasculature of peripheral lymphoid organs. The importance of the homeodomain transcription factor Nkx2-3 in the correct splenic vessel development is most strikingly illustrated by the redless spleen lacking nearly all of the red pulp.

In contrast to vessel formation in pLNs, little is known about vascular patterning in the spleen (1, 2, 4). A characteristic vascular segment formed during the early postnatal period in the rodent spleen is the marginal sinus composed of MAdCAM-1–positive cells (2, 44, 45). Allocation of MAdCAM-1$^+$ cells to the marginal sinus in the mouse spleen (43) is controlled by several signals and regulators, including Nkx2-3, which can probably activate the transcription of MAdCAM-1 directly (19). Inactivation of Nkx2-3 function affects the expression of MAdCAM-1 and also the formation of the spleen and Peyer's patches. In contrast, loss of LTα or LTβR blocks embryonic development of virtually all peripheral lymphoid organs, including the white pulp stroma of the spleen; however, segregation of vasculature into red pulp and white pulp territories takes place independently from LTβR ligands (14, 15, 17). The Nkx2.3-null mutation causes a particularly severe defect in splenic vasculature affecting all vascular segments in the red pulp, marginal zone, and white pulp as well (26). It results in nearly complete loss of red pulp vascular beds and disturbed white pulp architecture, thus offering the opportunity to analyze the putative role of red pulp on morphogenesis of the white pulp.

The *Nkx2-3*$^{-/-}$ mutant spleen contains vessels that fulfill the morphological and functional criteria of HEVs that are normally present only in pLNs. According to our qPCR data, these unusual splenic HEVs use predominantly GlyCAM-1 besides some other PNAd core proteins but no or very little MAdCAM-1 as homing receptor (28–33). Replacement of MAdCAM-1 by PNAd in the spleen of the *Nkx2-3*$^{-/-}$ mouse occurs postnatally, suggesting that early MAdCAM-1 expression may either not be controlled by Nkx2-3 or, alternatively, may be regulated by coexpressed proteins such as Nkx2-5, providing redundant functions. Besides Nkx2-3, expression of MAdCAM-1 is influenced by other regulators, such as relB/NF-κB (46), because NF-κB loss of function mutations in mice also lead to loss of marginal sinus-associated MAdCAM-1 expression (46, 47). In this context, NF-κB appears to act downstream of LTβR-mediated signals (41, 48). Preliminary gene expression analysis in *Nkx2-3*$^{-/-}$ mice failed to provide evidence for loss of LT-related ligands or receptors in agreement with the presence of splenic FDCs (20, 49), which depend on LTβR activity (23). Similarly to previous findings, we also confirm that although in Nkx2-3–mutant mice FDCs are present and produce CXCL13 chemokine (20), yet no follicles are formed, indicating that CXCL13 production needs to be complemented with Nkx2-3–dependent processes to promote follicle development in the spleen. According to this observation, Nkx2-3 does not seem to act upstream of lymphotoxin signaling, and it may indeed function in a parallel regulatory pathway. However, both regulators are dispensable for embryonic development of the mesenchymal spleen anlage, because in a double-mutant mouse the spleen is present.

It has been suggested that MAdCAM-1 glycoprotein in wild-type mice may be instrumental for proper clustering of endothelial cells (43). Because HEV-associated MAdCAM-1 is still present in the Nkx2.3$^{-/-}$ mutant spleen during the first two postnatal weeks when the white pulp and marginal zone architecture is established (25, 44, 45, 50), it is reasonable to assume that loss of additional, yet unidentified, proteins contributes to the adult spleen phenotype in this mutation. This view is in line with the observation that MAdCAM-1–deficient mice exhibit apparently no major alterations of the splenic architecture (51). Importantly, the regulation of MAdCAM-1 expression by Nkx2-3 appears to be different for endothelial cells and other cells, such as FDCs, because FDC-associated MAdCAM-1 expression is preserved in mutant Peyer's patches (20), whereas the HEV-associated MAdCAM-1 production is abolished, similarly to HEVs in mLNs. Thus, the differential effects of the absence of Nkx2-3 on the expression of MAdCAM-1 mRNA in pLN of wild-type and Nkx2-3–mutant mice (where mutants had a higher level) compared with mLNs (where wild-type mice showed a higher level of expression) is probably caused by the enlarged germinal centers containing MAdCAM-1–positive FDCs in pLNs of Nkx2-3 mutants and the presence of highly MAdCAM-1–positive HEVs in the wild-type mLNs, respectively.

The transformation of splenic vasculature into pLN-like vessels as a result of the *Nkx2-3* gene disruption emphasizes the importance of correct vessel formation for spleen ontogeny in mammals. The red pulp is formed during embryonic development when Nkx2-3 is expressed (15, 20), whereas expansion and compartmentalization of white pulp occur postnatally when Nkx2-3 expression is already downregulated. This scenario suggests that in the embryonic spleen Nkx2-3 may be directly responsible for the development of the red pulp sinus network that ascertains blood supply essential for tissue growth. Nkx2-3 also seems to be required to set up early progenitor cells for the correct vasculature in white pulp. Whether or not the function of Nkx2-3 in this process is to actively promote the appropriate cell fate for white pulp endothelium or to suppress HEV-fated endothelial progenitors is currently unclear. Alternatively, Nkx2-3 may play a role that affects postnatal development of the splenic vasculature in a non–cell-autonomous fashion, for instance, by changing stromal signals. However, the transformation of splenic vasculature to contain HEV-like vessels in the mutant spleen is not simply the consequence of defective red pulp development, as it is observed in BALB/c mutants that retain some red pulp and in Nkx2-3 mutants on other genetic backgrounds where red pulp is also present. In addition to the altered vascular organization, other cellular compartments including marginal zone macrophage subsets are also affected, leading to major functional deficits in lymphocyte recirculation and pathogenic uptake, and may explain defective immune responses in Nkx2-3–mutant mice (49). Taken together, our observations clearly demonstrate that Nkx2-3 is an important factor for the distinct vasculature in spleens well beyond the regulation of MAdCAM-1 by possibly determining the embryonic vascular patterning and recirculation activity in this secondary lymphoid organ.

Acknowledgments

We thank Drs. Nancy H. Ruddle and Ann Ager for helpful critical comments. We also thank Drs. Klaus Pfeffer and Falk Weih for providing the

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

ltbr$^{-/-}$ mice and Dr. Jeff L. Browning for supplying the LTβR–Ig fusion protein.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Mebius, R. E., and G. Kraal. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 606–616.
2. Balogh, P. 2007. The vascular bed of spleen in health and disease. In *Endothelial Biomedicine.* W. C. Aird, ed. Cambridge University Press, New York, p. 1255–1264.
3. Nolte, M. A., A. Hamann, G. Kraal, and R. E. Mebius. 2002. The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. *Immunology* 106: 299–307.
4. von Andrian, U. H., and T. R. Mempel. 2003. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 867–878.
5. Brendolan, A., M. M. Rosado, R. Carsetti, L. Selleri, and T. N. Dear. 2007. Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays* 29: 166–177.
6. Brendolan, A., E. Ferretti, V. Salsi, K. Moses, S. Quaggin, F. Blasi, M. L. Cleary, and L. Selleri. 2005. A Pbx1-dependent genetic and transcriptional network regulates spleen ontogeny. *Development* 132: 3113–3126.
7. Kim, B. M., I. Miletich, J. Mao, A. P. McMahon, P. A. Sharpe, and R. A. Shivdasani. 2007. Independent functions and mechanisms for homeobox gene Barx1 in patterning mouse stomach and spleen. *Development* 134: 3603–3613.
8. Wardemann, H., T. Boehm, N. Dear, and R. Carsetti. 2002. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J. Exp. Med.* 195: 771–780.
9. Lyons, I., L. M. Parsons, L. Hartley, R. Li, J. E. Andrews, L. Robb, and R. P. Harvey. 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev.* 9: 1654–1666.
10. Lettice, L. A., L. A. Purdie, G. J. Carlson, F. Kilanowski, J. Dorin, and R. E. Hill. 1999. The mouse bagpipe gene controls development of axial skeleton, skull, and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9695–9700.
11. Selleri, L., M. J. Depew, Y. Jacobs, S. K. Chanda, K. Y. Tsang, K. S. Cheah, J. L. Rubenstein, S. O'Gorman, and M. L. Cleary. 2001. Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128: 3543–3557.
12. Sánchez, M., B. Göttgens, A. M. Sinclair, M. Stanley, C. G. Begley, S. Hunter, and A. R. Green. 1999. An SCL 3′ enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors. *Development* 126: 3891–3904.
13. Withers, D. R., M. Y. Kim, V. Bekiaris, S. W. Rossi, W. E. Jenkinson, F. Gaspal, F. McConnell, J. H. Caamano, G. Anderson, and P. J. Lane. 2007. The role of lymphoid tissue inducer cells in splenic white pulp development. *Eur. J. Immunol.* 37: 3240–3245.
14. Mebius, R. E. 2003. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 292–303.
15. Vondenhoff, M. F., G. E. Desanti, T. Cupedo, J. Y. Bertrand, A. Cumano, G. Kraal, R. E. Mebius, and R. Golub. 2008. Separation of splenic red and white pulp occurs before birth in a LTαβ-independent manner. *J. Leukoc. Biol.* 84: 152–161.
16. Pasparakis, M., S. Kousteni, J. Peschon, and G. Kollias. 2000. Tumor necrosis factor and the p55TNF receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precursors into splenic follicles. *Cell. Immunol.* 201: 33–41.
17. Fu, Y. X., and D. D. Chaplin. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 399–433.
18. Pabst, O., R. Zweigerdt, 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.
19. 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.
20. 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.
21. Stanfel, M. N., K. A. Moses, R. J. Schwartz, and W. E. Zimmer. 2005. Regulation of organ development by the NKX-homeodomain factors: an NKX code. *Cell. Mol. Biol.* 51(Suppl. 51): OL785–OL799.
22. Bovári, J., T. Czömpöly, K. Olasz, H. H. Arnold, and P. Balogh. 2007. Complex organizational defects of fibroblast architecture in the mouse spleen with Nkx2.3 homeodomain deficiency. *Pathol. Oncol. Res.* 13: 227–235.
23. Endres, R., M. B. Alimzhanov, T. Plitz, A. Fütterer, M. H. Kosco-Vilbois, S. A. Nedospasov, K. Rajewsky, and K. Pfeffer. 1999. Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin β receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin β and tumor necrosis factor by B cells. *J. Exp. Med.* 189: 159–168.
24. Balogh, P., G. Horváth, and A. K. Szakal. 2004. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J. Histochem. Cytochem.* 52: 1287–1298.
25. Hemmerich, S., A. Bistrup, M. S. Singer, A. van Zante, J. K. Lee, D. Tsay, M. Peters, J. L. Carminati, T. J. Brennan, K. Carver-Moore, et al. 2001. Sulfation of L-selectin ligands by an HEV-restricted sulfotransferase regulates lymphocyte homing to lymph nodes. *Immunity* 15: 237–247.
26. Balogh, P., M. Balázs, T. Czömpöly, D. S. Weih, H. H. Arnold, and F. Weih. 2007. Distinct roles of lymphotoxin-β signaling and the homeodomain transcription factor Nkx2.3 in the ontogeny of endothelial compartments in spleen. *Cell Tissue Res.* 328: 473–486.
27. Nolte, M. A., G. Kraal, and R. E. Mebius. 2004. Effects of fluorescent and non-fluorescent tracing methods on lymphocyte migration in vivo. *Cytometry A* 61: 35–44.
28. Imai, Y., L. A. Lasky, and S. D. Rosen. 1993. Sulphation requirement for GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin. *Nature* 361: 555–557.
29. Baumheter, S., M. S. Singer, W. Henzel, S. Hemmerich, M. Renz, S. D. Rosen, and L. A. Lasky. 1993. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 262: 436–438.
30. Berg, E. L., L. M. McEvoy, C. Berlin, R. F. Bargatze, and E. C. Butcher. 1993. L-selectin–mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 366: 695–698.
31. Kanda, H., T. Tanaka, M. Matsumoto, E. Umemoto, Y. Ebisuno, M. Kinoshita, M. Noda, R. Kannagi, T. Hirata, T. Murai, et al. 2004. Endomucin, a sialomucin expressed in high endothelial venules, supports L-selectin–mediated rolling. *Int. Immunol.* 16: 1265–1274.
32. Umemoto, E., T. Tanaka, H. Kanda, S. Jin, K. Tohya, K. Otani, T. Matsutani, M. Matsumoto, Y. Ebisuno, M. H. Jang, et al. 2006. Nepmucin, a novel HEV sialomucin, mediates L-selectin–dependent lymphocyte rolling and promotes lymphocyte adhesion under flow. *J. Exp. Med.* 203: 1603–1614.
33. Sassetti, C., K. Tangemann, M. S. Singer, D. B. Kershaw, and S. D. Rosen. 1998. Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J. Exp. Med.* 187: 1965–1975.
34. Rosen, S. D. 2004. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 129–156.
35. Streeter, P. R., B. T. Rouse, and E. C. Butcher. 1988. Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J. Cell Biol.* 107: 1853–1862.
36. Gallatin, W. M., I. L. Weissman, and E. C. Butcher. 1983. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304: 30–34.
37. Link, A., T. K. Vogt, S. Favre, M. R. Britschgi, H. Acha-Orbea, B. Hinz, J. G. Cyster, and S. A. Luther. 2007. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat. Immunol.* 8: 1255–1265.
38. Gunn, M. D., K. Tangemann, C. Tam, J. G. Cyster, S. D. Rosen, and L. T. Williams. 1998. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 258–263.
39. Guo, F., D. Weih, E. Meier, and F. Weih. 2007. Constitutive alternative NF-κB signaling promotes marginal zone B-cell development but disrupts the marginal sinus and induces HEV-like structures in the spleen. *Blood* 110: 2381–2389.
40. Mebius, R. E., P. R. Streeter, S. Michie, E. C. Butcher, and I. L. Weissman. 1996. 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* 93: 11019–11024.
41. Drayton, D. L., X. Ying, J. Lee, W. Lesslauer, and N. H. Ruddle. 2003. Ectopic LTαβ directs lymphoid organ neogenesis with concomitant expression of peripheral node addressin and a HEV-restricted sulfotransferase. *J. Exp. Med.* 197: 1153–1163.
42. Browning, J. L., N. Allaire, A. Ngam-Ek, E. Notidis, J. Hunt, S. Perrin, and R. A. Fava. 2005. Lymphotoxin-β receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. *Immunity* 23: 539–550.
43. Zindl, C. L., T. H. Kim, M. Zeng, A. S. Archambault, M. H. Grayson, K. Choi, R. D. Schreiber, and D. D. Chaplin. 2009. The lymphotoxin $LT\alpha_1\beta_2$ controls postnatal and adult spleen marginal sinus vascular structure and function. *Immunity* 30: 408–420.
44. Balázs, M., G. Horváth, L. Grama, and P. Balogh. 2001. Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. *Cell. Immunol.* 212: 126–137.
45. Chen, Y., T. Pikkarainen, O. Elomaa, R. Soininen, T. Kodama, G. Kraal, and K. Tryggvason. 2005. Defective microarchitecture of the spleen marginal zone and impaired response to a thymus-independent type 2 antigen in mice lacking scavenger receptors MARCO and SR-A. *J. Immunol.* 175: 8173–8180.
46. Sampaio, S. O., X. Li, M. Takeuchi, C. Mei, U. Francke, E. C. Butcher, and M. J. Briskin. 1995. Organization, regulatory sequences, and alternatively spliced transcripts of the mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) gene. *J. Immunol.* 155: 2477–2486.
47. Weih, D. S., Z. B. Yilmaz, and F. Weih. 2001. Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. *J. Immunol.* 167: 1909–1919.
48. Weih, F., and J. Caamaño. 2003. Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-κB signal transduction pathway. *Immunol. Rev.* 195: 91–105.
49. Tarlinton, D., A. Light, D. Metcalf, R. P. Harvey, and L. Robb. 2003. Architectural defects in the spleens of Nkx2-3–deficient mice are intrinsic and associated with defects in both B cell maturation and T cell-dependent immune responses. *J. Immunol.* 170: 4002–4010.
50. Balogh, P., Y. Aydar, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 2001. Ontogeny of the follicular dendritic cell phenotype and function in the postnatal murine spleen. *Cell. Immunol.* 214: 45–53.
51. 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.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

dc_1678_19
Check for updates

Journal of Histochemistry & Cytochemistry 59(7) 690–700
© The Author(s) 2011
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1369/0022155411410061
http://jhc.sagepub.com
SAGE

Absence of Nkx2-3 Homeodomain Transcription Factor Induces the Formation of LYVE-1–Positive Endothelial Cysts without Lymphatic Commitment in the Spleen

Zoltán Kellermayer[1], Árpád Lábadi[1], Tamás Czömpöly, Hans-Henning Arnold, and Péter Balogh

Department of Immunology & Biotechnology, University of Pécs, Faculty of Medicine, Hungary (ZK,AL,TC,PB), and Department of Cell & Molecular Biology, Institute of Biochemistry & Biotechnology, Technical University of Braunschweig, Germany (HHA).

Summary

In contrast to peripheral lymph nodes possessing lymphatic and blood vasculature, the spleen in both humans and rodents is largely devoid of functioning lymphatic capillaries. Here it is reported that in mice lacking homeodomain transcription factor Nkx2-3, the spleen contains an extensive network of lymphocyte-filled sacs lined by cells expressing LYVE-1 antigen, a marker associated with lymphatic endothelium cells (LECs). Real-time quantitative PCR analyses of Nkx2-3 mutant spleen revealed a substantial increase of LYVE-1 and podoplanin mRNA levels, without the parallel increase of mRNA for VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor receptor Type 3) and Prox1 (Prospero homeobobox protein 1), two markers specific for LECs. Although these structures express VEGFR-2/flk-1, they lack Prox1 protein, indicating their non-LEC endothelial origin. The LYVE-1$^+$ structures are bordered with ER-TR7$^+$ fibroblastic reticular cells with small clusters of macrophages expressing MARCO and sialoadhesin. Short-term cell-tracing studies using labeled lymphocytes indicate that these LYVE-1$^+$ cysts are largely excluded from the systemic circulation. Cells expressing LYVE-1 glycoprotein as putative precursors for such structures are detectable in the spleen of late-stage embryos, and the formation of LYVE-1$^+$ structures is independent from the activity of lymphotoxin β-receptor. Thus the splenic vascular defects in Nkx2-3 deficiency include the generation of LYVE-1$^+$ cysts, comprised of endothelial cells without being committed along the LEC lineage. (J Histochem Cytochem 59:690–700, 2011)

Keywords

Nkx2-3, spleen, LYVE-1, endothelium, development

The architecture of the various secondary lymphoid organs is closely coupled to the circulation of lymphocytes at these tissues. The main elements of blood vasculature in lymph nodes and Peyer's patches are the high endothelial venules (HEVs), which mediate leukocyte homing through the binding of L-selectin expressed on leukocytes. Besides their blood circulation, lymph nodes are also richly perfused by lymphatic vasculature, characterized by the expression of LYVE-1 hyaluronan receptor (Prevo et al. 2001) and Prox1 (Prospero homeobox protein 1) transcription factor (Wigle and Oliver 1999; Wigle et al. 2002), a fate-determining regulator for the embryonic differentiation of lymphatic endothelial cells (LECs).

The vascular pattern and thus the structure of the spleen considerably differ from those of peripheral lymph nodes or Peyer's patches. The splenic artery divides into smaller branches termed central arterioles, which are surrounded by T-cell area. Subsequent segments of these central arterioles

Received for publication January 20, 2011; accepted April 6, 2011.

[1]These authors contributed equally.

Corresponding Author:
Péter Balogh, Department of Immunology & Biotechnology, University of Pécs, Faculty of Medicine, Szigeti út 12., H-7624 Pécs, Hungary
Email: peter.balogh@aok.pte.hu

dc_1678_19

continue through the B-cell follicles to the terminal arterioles (in human) or marginal sinuses (in rodents). These vessels end in the highly fenestrated network of sinuses in the red pulp, lined by different endothelial subsets (Balogh and Lábadi, 2011; Mebius and Kraal 2005). In the red pulp of human spleens, blood capillaries expressing CD34 are located in the central parts of fibroblastic cords, without making direct anastomoses with sinuses identifiable through their endothelial CD141 expression. In addition, these vessels display CD8 and mannose receptor (Giorno 1984; Martinez-Pomares et al. 2005; Steiniger et al. 2007). In mice, our own observations indicate a similar complexity by using endothelium subset-reactive monoclonal antibodies (Balázs et al. 1999; Balázs et al. 2001). Although capillaries with the characteristics of lymphatic vessels were described in mouse, it is uncertain whether real lymphatic vessels exist in the murine or human spleen and to what extent these contribute to lymphocyte recirculation or interstitial fluid flow (Pellas and Weiss 1990).

Several transcription factors, including homeobox transcription factor Nkx2-3, have been identified as important regulators of spleen ontogeny (Brendolan et al. 2007; Pabst el al. 1999; Pabst et al. 2000; Wang et al. 2000). Nkx2-3 transcription factor belongs to the structurally conserved Nk family of 18 members sharing a common DNA recognition sequence. This group of transcription factors is involved in the cell type specification of visceral mesoderm, including heart, lungs, pancreas, gastrointestinal tract, central nervous system, and skeleton, in a highly complex expression pattern (Stanfel et al. 2005). Furthermore, various members of the lymphotoxin/tumor necrosis factor (LT/TNF) family also crucially contribute to the formation of lymphoid compartments within the spleen, including the development of marginal sinus influenced by signaling through the receptor for lymphotoxin β (LTβR) (Fütterer et al. 1998). In contrast to the vascular defects restricted to the marginal sinus in mice deficient for LTβR, however, *nkx2-3*$^{-/-}$ mice display an extensive range of vascular disorganization, manifested in the absence of the marginal sinus and an atrophic red pulp sinus network (Balogh et al. 2007; Pabst et al. 2000; Wang et al. 2000). Other roles of Nkx2-3 related to altered lymphoid tissue induction outside the spleen have been suggested by the SNPs in patients with inflammatory bowel diseases, often associated with ectopic lymphoid tissue formation (Franke et al. 2008; Parkes et al. 2007).

Here, we report that the spleen in *nkx2-3*$^{-/-}$ mouse contains LYVE-1^{+} vascular-like structures, without expressing Prox1 transcription factor. We also determine their structural, phenotypic, and developmental characteristics. Cell tracing experiments demonstrate that they are excluded from the systemic circulation. The formation of these structures is independent from the activity of LTβR, and the absence of Prox1 transcription factor suggests that these vessels may represent embryonic endothelial remnants in the spleen of adult Nkx2-3 mutant mice.

Materials and Methods

Mice

Nkx2-3$^{-/-}$ mice from 129SvxB6 mixed background (Pabst et al. 1999) were backcrossed with BALB/c mice (obtained from Charles River, Gödöllő, Hungary) through 14 generations. C57Bl/6 and 129Sv Nkx2-3 mutants were maintained at the Technical University of Braunschweig. For homing studies, BALB/c mice from the faculty's SPF breeding unit were used as lymphocyte donor for adoptive transfer. LTβR-deficient mice (Fütterer et al. 1998) were kindly provided by Drs. Klaus Pfeffer and Falk Weih. 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. The Nkx2-3/LTβR double knockout mice were identified in the F2 generation by simultaneous PCR amplification of the *nkx2-3, neomycin phosphotransferase*, and *ltbr* loci from genomic DNA using the following primer pairs: *nkx2-3:* forward GCGGGAGACTGTAAGACGAG, reverse TTATCCTGCCGCTGTCTCTT, amplicon size: 238 bp; *neomycin phosphotransferase*: forward GTCGATCAGGA TGATCTGGAC, reverse AAGGCGATAGAAGGCGATGC, amplicon size: 321 bp, *ltbr*: forward GCATGTAGCCAT GAAGACAGGAT, reverse CGCAAAGACAAACTCGC CTAT, amplicon size: 150 bp.

Antibodies and Reagents

Rat monoclonal antibody (mAb) against mouse fibroblastic reticular cell markers (clone ER-TR7) was kindly provided by Dr Willem van Ewijk. Anti-Thy-1/CD90 (clone IBL-1), IBL-11 mAb against reticular fibroblasts, anti-MARCO (clone IBL-12), and anti-sialoadhesin/CD169 (clone IBL-13) mAbs were developed in our laboratory (Balogh et al. 1992; Balogh et al. 2004; Kvell et al. 2006). For multicolor immunofluorescence, IBL-1 mAb was conjugated with FITC (Sigma-Aldrich Hungary, Budapest) according to standard procedures. Rat hybridoma cell line secreting anti-B220 (clone RA3-6B2) was obtained from ATCC and was conjugated with Alexa 647 (Invitrogen, Csertex Ltd, Budapest). Rat mAb against LYVE-1 (clone 223322) was obtained from R&D Systems (Biomedica Hungary Kft, Budapest) and was biotinylated with sulfo-*N*-hydroxysuccinimide biotin ester (Sigma-Aldrich Hungary, Budapest). Anti-VEGFR-2/flk1 (vascular endothelial growth factor receptor Type 2) mAb (clone Avas 12α1) was obtained from BD Biosciences (Soft Flow Ltd, Pécs, Hungary). Rabbit antibodies against Prox1 were purchased from AngioBio (Del Mar, CA) and were detected with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich, Hungary). Streptavidin-Alexa Fluor 350 was purchased from Invitrogen. Unlabeled rat mAbs were detected with phycoerythrin-conjugated goat anti-rat IgG purchased from BD.

dc_1678_19

Table 1. Primers Used for Quantitative PCR Analyses

No.	Forward	Reverse
Prox1	TGTCCGACATCTCACCTTATTCA	GCGGGTGTAAAAGAACATGAGTT
Pdpn/Gp38 (Podoplanin)	GTGCTACTGGAGGGCTTAATGAA	GCTTCGTCCCACGCTCTCT
Flt4/Vegfr3	GGTTCCTGATGGGCAAAGG	TCAGTGGGCTCAGCCATAGG
Lyve1	GGAGCAGCATTCAAGAACGAA	GCGGCAGCACCAAAGAAG
Nkx2-3	TTATCCTGCCGCTGTCTCTT	GCGGGAGACTGTAAGACGAG

Immunohistochemistry and Immunofluorescence

Frozen and acetone-fixed sections were blocked with 5% BSA in PBS for 20 min. Single immunofluorescence was performed using anti-LYVE-1 mAb followed by phycoerythrine (PE)–conjugated goat anti rat IgG. For multiple immunofluorescence, unlabeled rat mAbs were detected using PE-conjugated anti-rat IgG, followed by saturation with 5% normal rat serum. Subsequently, FITC-conjugated and biotinylated antibodies were added in cocktail, followed by the visualization of latter reagents with Streptavidin-Alexa Fluor 350. Control staining included irrelevant rat IgG at 10 μg/ml purified from normal rat serum using protein G affinity chromatography. After mounting, the sections were viewed under an Olympus BX61 fluorescent microscope. The acquisition of digital pictures with a CCD camera was performed using the analySIS software. The pictures were edited with Adobe Photoshop, using adjustments for brightness contrast and black level for the entire images.

Electron Microscopy

After removal the spleens were cut in 2 to 3 pieces at a volume less than 1 mm^3. The tissue was placed in 2.5% buffered glutaraldehyde for 3 hr at room temperature under continuous agitation. Following fixation, the tissue was washed several times with phosphate buffer. The blocks were placed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer (pH: 7.2) for 1 hr. After osmication and washing, the tissue blocks were dehydrated in an ascending ethanol series, with uranyl acetate (1%) included in the 70% ethanol stage. The tissues were placed into aluminum-foil boats containing Durcupan resin (Sigma-Aldrich, Budapest) and then embedded in gelatin capsules containing the same resin. Semithin and serial ultrathin sections were cut with a Leica ultramicrotome. Semithin sections (1 μm thick) were mounted on glass slides and stained with toluidine blue. Ultrathin sections (80 nm thick) were mounted either on mesh or on collodion-coated (Parlodion, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) single-slot, copper grids. Additional contrast was provided to these sections with uranyl acetate and lead citrate, and they were examined in JEOL 1200EX-II electron microscope. The negative photographs were developed and scanned into computer, from which digitalized pictures were generated.

Adoptive Cell Transfer

Lymphocytes from lymph nodes were isolated and labeled with 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE, Invitrogen) as described (Nolte et al. 2002). For lymphocyte homing studies, 200 μl of cell suspension at 5×10^7 CFSE-labeled cells was injected intravenously, followed by the removal of spleen at various intervals. The distribution of cells was tested by immunofluorescence using anti-LYVE-1 in conjunction with PE-labeled anti-rat IgG.

Quantitative RT-PCR (qPCR)

Total RNA was isolated with RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Budapest) and was treated with DNase I (Sigma-Aldrich, Budapest). cDNA was prepared with a High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Budapest). PCR primers used for real-time quantitative amplification of Prox1, Pdpn, Flt4, Lyve1, 18S ribosomal RNA, and Hprt1 were designed by Primer Express Software (Applied Biosystems, Table 1). PCR reactions were run in triplicates using Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems) on an ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Standard curves were generated for each transcript and expression levels were normalized to β-actin.

Statistical Analysis

Normal distributions of means were tested with one-sample Kolmogorov-Smirnov test. Means were compared with one-way ANOVA followed by Bonferroni test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed with SPSS 14.0 software.

Results

Presence of LYVE-1$^+$ Endothelial Sacs in the Spleen of Mice Lacking Nkx2-3

Our previous work established the substantial alteration of blood vasculature of the red pulp in mice with deleted Nkx2-3 (Balogh et al. 2007). Further histological and electron microscopic analyses of *nkx2-3*$^{-/-}$ spleen revealed dilated vessel-like structures tightly filled with lymphocytes, reminiscent of lymphatic vessels (Figure 1A and B).

dc_1678_19

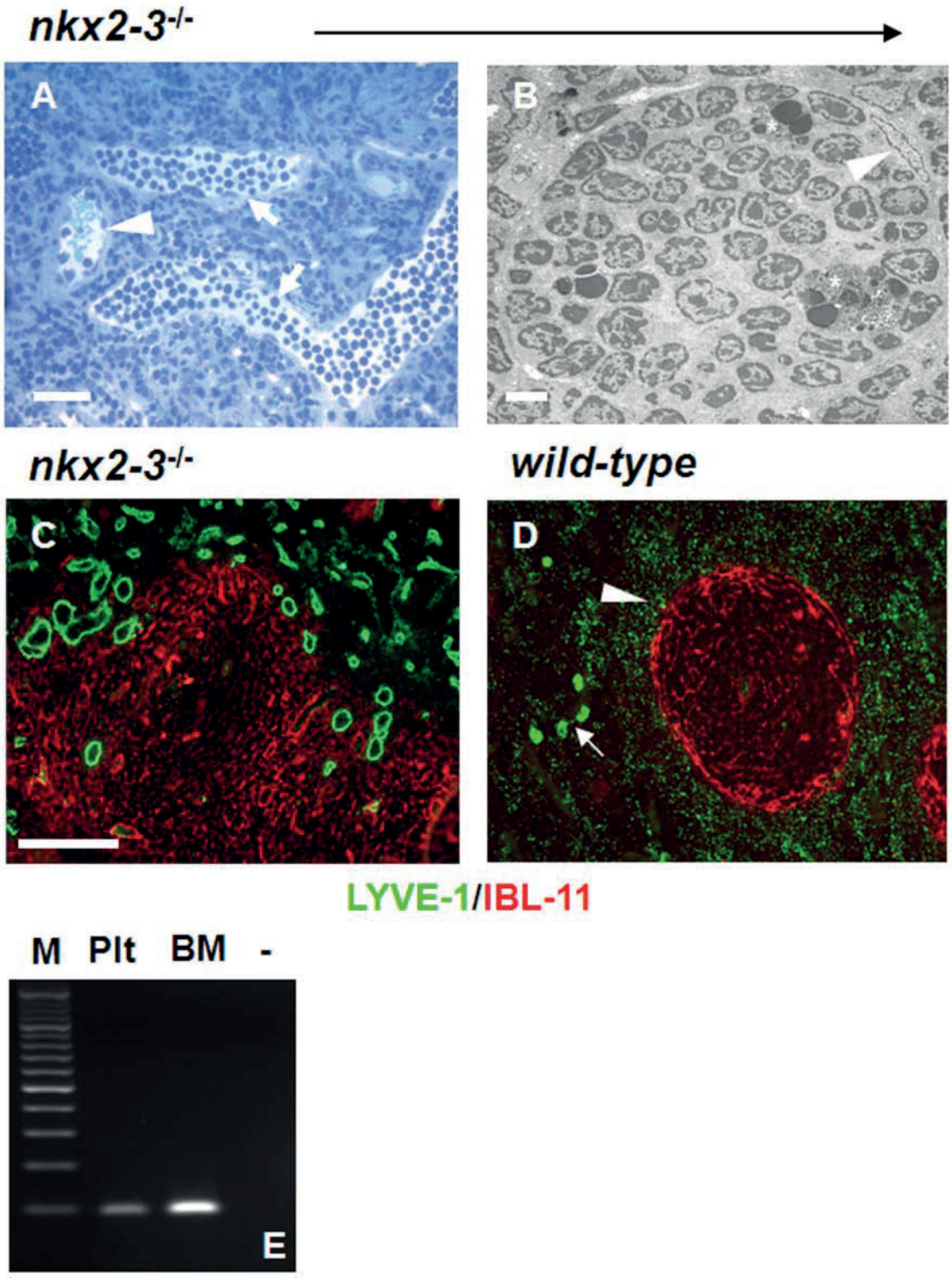


Figure 1A-E. Deficiency of Nkx2-3 induces the formation of LYVE-1$^+$ vessels. Semi-thin section stained with toluidine blue (A) demonstrates two lymphocyte-filled vascular segments (arrows) and a blood capillary (arrowhead; scale bar = 50 µm). Transmission electron microscopy (B) shows lymphoid cells filling a sac-like structure, lined by mesenchymal cells with elongated nucleus (arrowhead; scale bar = 7.5 µm). LYVE-1-positive structures in the spleen of *nkx2-3*$^{-/-}$ mice (C) accumulate mainly in the peripheral segment (upper part) of the spleen, without IBL-11-positive fibroblastic cuff. The scale bar = 200 µm. In wild-type spleen (D), LYVE-1 reactivity reveals platelets (arrowhead) in the marginal zone and megakaryocytes (arrow) in red pulp; the white pulp is outlined by IBL-11$^+$ fibroblasts. The scale bar = 200 µm. (E) LYVE-1 mRNA expression is detected by RT-PCR in platelet-enriched plasma (Plt) and bone marrow (BM) from wild-type mouse. Negative control (–) contained water (M: 100 bp ladder).

dc_1678_19

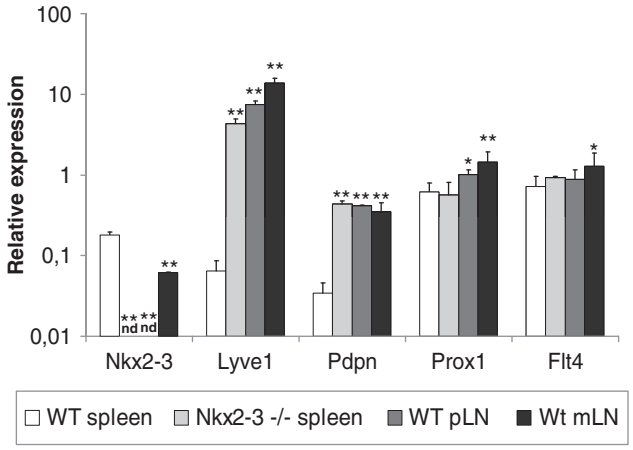


Figure 2. Comparison of the expression pattern of lymphatic endothelium associated genes and Nkx2-3 by quantitative PCR normalized to β-actin. Samples included spleens from wild-type (WT) and Nkx2-3–deficient mice and also peripheral lymph nodes (pLN) and mesenteric lymph nodes (mLN). The target genes were Nkx2-3, Lyve1, podoplanin/gp38 (Pdpn), Prox1, and Flt4/Vegfr3. Bar diagram shows the mean ± SD of six parallel samples of three mice. *$p < 0.05$; **$p < 0.001$; nd, not detectable.

Extended analysis using a battery of endothelium-subset specific antibodies included anti-LYVE-1 antibody, a marker frequently used to delineate lymphatic capillaries (Prevo et al. 2001), in conjunction with IBL-11 mAb against circumferential reticulum cells in marginal zone as topographic marker (Balogh et al. 2004). Staining spleen sections from Nkx2-3 mutant and wild-type samples with anti-LYVE-1 antibody resulted in intense labeling of mutants, completely delineating these structures. These vascular–cystic structures were mostly located at the periphery of the mutant organ (Figure 1C). In contrast, LYVE-1 immunofluorescence in wild-type spleen was limited to megakaryocytes in red pulp and platelets in the marginal zone outside the IBL-11-positive fibroblastic ring, without revealing any lymphatic capillaries (Figure 1D). The presence of LYVE-1 mRNA expression detectable by RT-PCR in platelet-enriched plasma and in bone marrow from wild-type mice is also consistent with its protein expression in these cell types (Figure 1E).

Biased Expression of mRNA of Lymphatic Endothelium-associated Marker Genes

Next we investigated whether the absence of Nkx2-3 affects the expression of mRNA for other lymphatic endothelium-associated genes using quantitative real-time PCR (qPCR) in adult mutant spleen and then compared it with wild-type controls. Our findings revealed a substantial upregulation of mRNA for LYVE-1 (66.8-fold) and podoplanin (12.1-fold, Pdpn also known as gp38; Breiteneder-Geleff et al. 1999) compared with Wild-type (Figure 2). Both genes in mutant spleen reached expression levels comparable with peripheral lymph nodes (pLN) and mesenteric lymph nodes (mLN). In contrast, Prox1 (Wigle 1999) and Flt4 (Kaipanen et al. 1995) (also known as VEGFR-3), two other specific marker genes for mouse lymphatic endothelium, did not differ between the wild-type and mutant spleen. We also investigated the mRNA expression of Nkx2-3. We found that in wild-type pLN Nkx2-3, mRNA was undetectable, while in mesenteric lymph nodes (mLN) it was expressed at a lower level compared with wild-type spleen.

Dual immunofluorescent labeling for Prox1 and LYVE-1 showed overlapping expression in normal pLNs but failed to reveal any Prox1 protein in Nkx2-3 mutant spleen (Figure 3A-D), in agreement with our results on the absence of upregulated Prox1 mRNA. However, the double staining of these structures with VEGFR-2/flk-1 and LYVE-1 indicated their endothelial, albeit non-LEC, origin (Figure 3E-G), although the LYVE-1^+ compartment of splenic vessels had a weaker VEGFR-2 staining compared with the LYVE-1^- segments (Figure 3F).

Internal Content and Stromal Tissue Microenvironment in LYVE-1+ Sacs

To investigate whether the LYVE-1^+ sacs have any ordered arrangement of enclosed lymphocyte subpopulations, we stained mutant spleens for T and B cells. In addition, we also analyzed their mesenchymal and stromal surroundings using mAbs against fibroblastic reticular cells (FRCs) and resident splenic macrophage subsets. We found that similar to the T-cell dominance in these mutant spleens (Czömpöly et al. in press), the LYVE-1^+ structures overwhelmingly contained T cells. The B lymphocytes were typically arranged in a scattered pattern (Figure 4A). Macrophage subsets expressing MARCO or sialoadhesin/CD169 that in normal spleen delineate the marginal zone (Mebius and Kraal 2005) formed small clusters adjacent to the LYVE-1^+ structures in mutant spleens (Figure 4B and C). In contrast, ER-TR7^+ FRCs closely surrounded the LYVE-1^+ endothelial cells. However, no ER-TR7 reactivity could be found within the sacs, indicating the absence of FRCs, in agreement with the cyst-like architecture of these structures (Figure 4D).

Limited Entry of Lymphocytes into LYVE-1^+ Cysts

To test whether circulating lymphoid cells can enter the LYVE-1^+ cysts, adoptive cell transfer experiments were performed. Tracing of CFSE-labeled lymphocytes after intravenous injection revealed only occasional transplanted cells within the LYVE-1^- positive compartment after 20 min and only a few scattered cells after 8 hr (Figure 5). Cell counting revealed that the ratio between the cells located

dc_1678_19

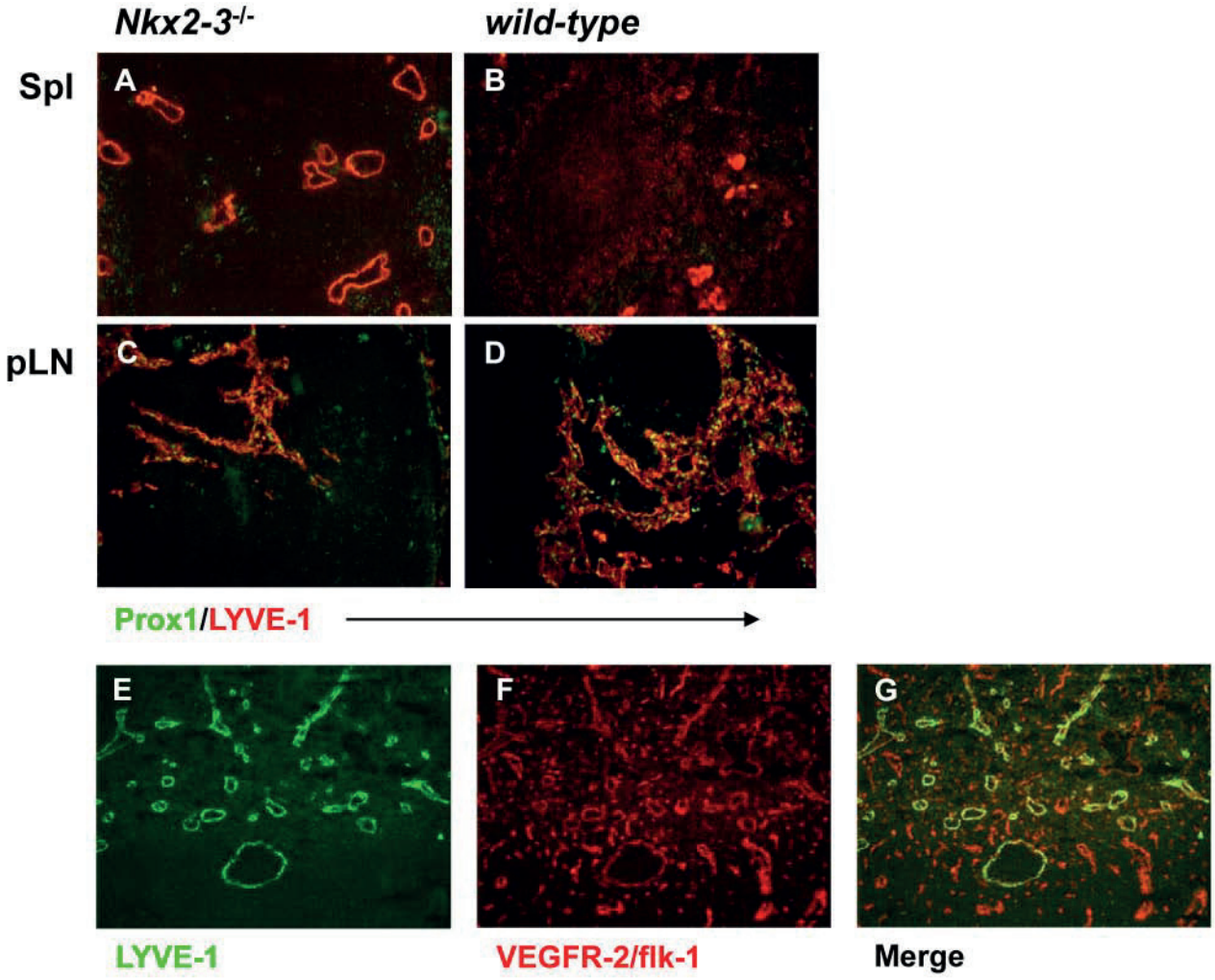


Figure 3. Nonlymphatic endothelial characteristics of LYVE-1$^+$ structures. LYVE-1$^+$ structures (red) in mutant spleen (A) do not express Prox1 transcription factor (green); in wild-type spleen (B) only platelets and megakaryocytes display LYVE-1, whereas lymph node lymphatic endothelium cells in both Nkx2-3 mutants and wild-type samples (C/D) coexpress both markers (merged as yellow). Cells lining LYVE-1$^+$ sacs coexpress VEGFR-2/flk-1 endothelial marker. (E, LYVE-1; F, VEGFR-2/flk-1; G, Merge.) Scale bar, 200 μm.

within and outside the sacs was initially 1.4:58.6 cells (approximately 2.3%), whereas after 8 hr it rose to 55.3:455.8 (12.1%) in a 1.4-mm^2 area of spleen section. Together with the absence of erythroid cells, this finding indicates that these LYVE-1$^+$ structures are not directly linked to the systemic blood circulation; however, some lymphocyte exchange occurs.

Formation of LYVE-1$^+$ Structures in Nkx2-3 Mutant Spleen Is Initiated in the Embryonic Period and Does Not Require LTβR Signaling

In addition to adult LECs, murine embryonic vessels have recently been demonstrated to display LYVE-1 glycoprotein (Gordon et al. 2008). To investigate whether the embryonic spleen contains LYVE-1$^+$ vessels, we stained E18.5 spleens from both wild-type and Nkx2-3–deficient mice for LYVE-1 expression. We found that in Nkx2-3–deficient embryos, LYVE-1–positive structures were present although did not yet form discernible sacs. In contrast, in wild-type mice no such structures could be identified (Figure 6A and B). Shortly after birth in mutant mice, similar structures could be found typically within the central region of the spleen; however, by the second week the LYVE-1$^+$ structures achieved adult-type appearance, including their repositioning to the peripheral segment of the organ (Figure 6C-F).

In addition to promoting the maturation of blood vasculature in embryonic peripheral lymphoid organs into adult-type HEV, the sprouting of lymphatic capillaries may be influenced

dc_1678_19

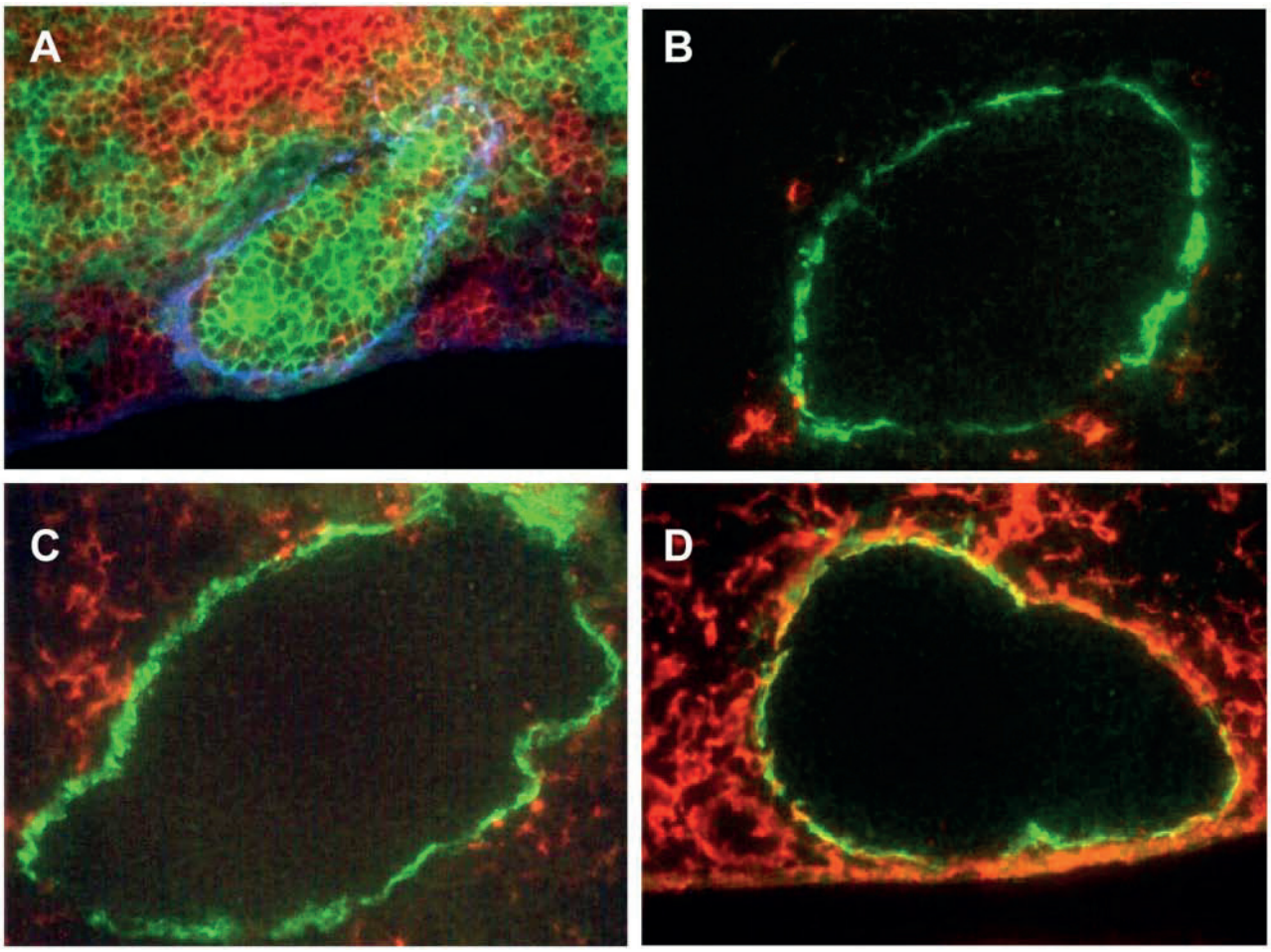


Figure 4. Internal and external composition of LYVE-1$^+$ structures. (A) The LYVE-1$^+$ sacs (blue) are mostly filled with T lymphocytes (green), with occasional B cells or their smaller groups (red). Macrophages (red) expressing MARCO (B) or sialoadhesin (C) form only occasional associations with LYVE-1$^+$ structures (green), which are tightly encircled with ER-TR7$^+$ fibroblastic reticular cells antigen (D, red). Scale bar, 100 μm.

by LTβR by inducing the production of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, a lymphangiogenic ligand for VEGFR-3 (Vondenhoff et al. 2009). To test whether the formation of splenic LYVE-1$^+$ structures in Nkx2-3 mutants requires LTβR, we established double mutants deficient for both Nkx2-3 and LTβR. We found that the LYVE-1-positive vessels were present in the double mutant spleens; thus, their formation is independent of LTβR signaling (Figure 6G and H). In addition, in double mutants the LYVE-1$^+$ structures were more numerous in the central region than in Nkx2-3 single mutant samples, and their appearance was more similar to vascular than cyst-like structures.

Discussion

The present report describes the appearance of aberrant endothelial structures formed by cells resembling lymphatic endothelium in the spleen of mice deficient for homeodomain transcription factor Nkx2-3. To our knowledge, no such aberrant structures have been reported in other mutations affecting the splenic vasculature; thus, their study offers a unique opportunity to facilitate the understanding of splenic endothelial maturation and vascular patterning.

Beyond their importance as structural elements in peripheral lymphoid organs, the specification of vasculature is also essential for maintaining the immunological surveillance by simultaneously providing access during leukocyte homing, and entry routes for pathogens, via either lymphatic vessels in lymph nodes or bloodstream in spleen, respectively. In this process, several transcription factors and other morphogenic regulators have been identified that promote the embryonic specification toward lymphatic endothelium and the expansion of these LEC-committed cells. These factors include Prox1 and VEGFR-3, and their

dc_1678_19

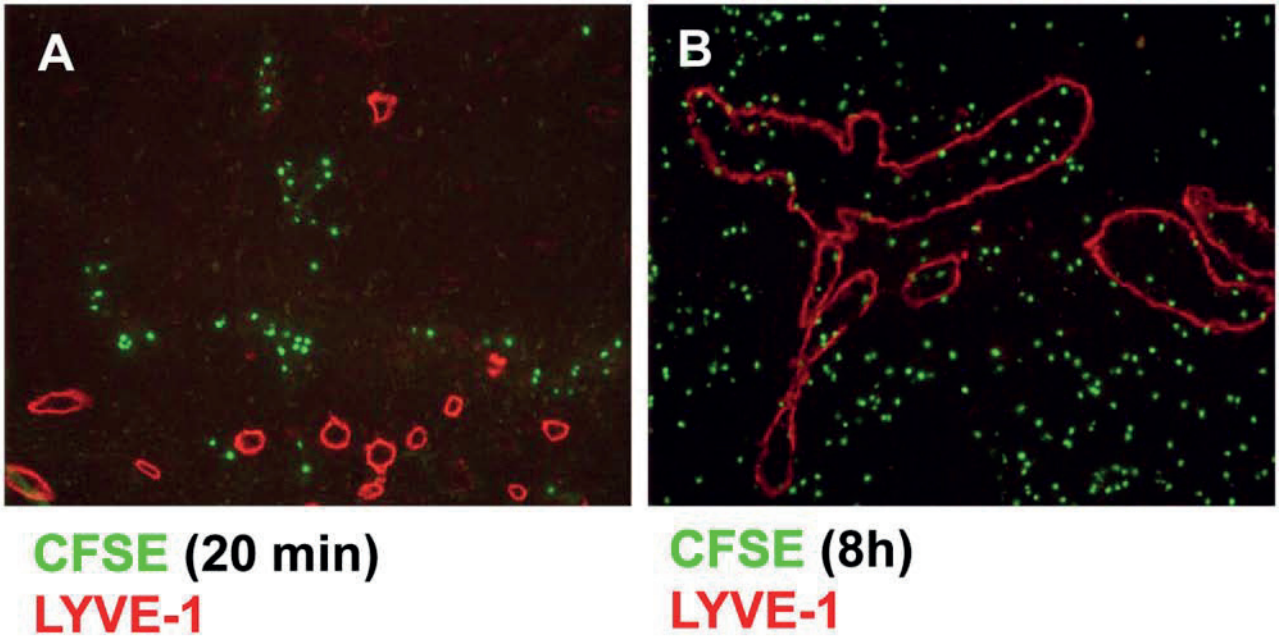


Figure 5. LYVE-1$^+$ vessels do not contribute to the early splenic recirculation of lymphocytes. The ratio of carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE)–labeled cells within/outside the sacs was 0.023 at 20 minutes (A), whereas at 8 hr (B) the ratio was 0.12 (1.4-mm^2 area). The picture is representative of three independent experiments performed on five mice; the scale bar = 200 µm.

effects are marked by the continued expression of LYVE-1 and the induction of podoplanin as LEC-associated markers (Oliver and Srinivasan, 2010). Furthermore, the blood vasculature in developing lymph nodes also undergoes substantial transformation into HEVs upon the engagement of LTβR (Browning et al. 2005), which also promotes the local expansion of LECs (Vondenhoff et al. 2009).

In contrast to the lymph nodes with detailed knowledge on the vascular specification, substantially less is known about the establishment of the splenic vasculature, mostly because of its complexity in both humans and mice (Balogh and Lábadi, 2011). In mice the process of red pulp vascular maturation is nearly completed by the time of birth, apparently independently from the activity of LTβR during the embryonic period (Balázs et al. 2001; Vondenhoff et al. 2008). In contrast, Nkx2-3 in a unique fashion blocks the development of the red pulp vasculature, and the absence of either Nkx2-3 or LTβR impairs the subsequent formation of marginal sinus in mice (Balogh et al. 2007). However, the expression of Nkx2-3 in spleen declines well before birth (Wang et al. 2000), indicating that its absence is also likely to manifest during the embryonic period, supported by our finding of the late embryonic appearance of LYVE-1$^+$ cell clusters in the spleen of Nkx2-3 mutants. In age-matched wild-type controls, LYVE-1$^+$ vascular segments could be observed only in the stomach but not in the spleen (not shown). It is not yet known how the absence of Nkx2-3 results in the upregulation of *Lyve1* mRNA, although in silico analyses for possible binding sites within the promoter region of *Lyve1* gene indicate a number of putative recognition sequences, thus raising a possible repressor effect of Nkx2-3 for *Lyve1* expression under normal conditions. Although the promoter region of *Prox1* also contains putative Nkx2-3 recognition sequences, its unaltered expression in mutant spleens indicates that its expression is either unrelated to the activity of Nkx2-3 or that other members of the Nkx family (e.g., Nkx2-5) may compensate its absence.

The formation of lymphatic vessels is coupled with phenotypic maturation of LEC-committed endothelial cells, which is critically influenced by Prox1 fate-determining transcription factor. This process is characterized by the appearance of several LEC-associated cell surface molecules, including LYVE-1 and podoplanin. Although the expression of podoplanin/gp38 mRNA in mutants is also elevated, it can be attributed to the expanded fibroblastic reticular meshwork associated with the enlarged T-cell pool in these mutants (Bovári et al. 2007). Importantly, LYVE-1 molecule can also be displayed by inflammatory macrophages (Maruyama et al. 2005; Schledzewski et al. 2006) similarly to podoplanin/gp38, another marker for LECs, which can be expressed by splenic macrophages (Hou et al. 2010). Together with our observation on the expression of LYVE-1 by megakaryocytes and platelets, this suggests that the usual phenotypic markers used for identifying LECs in lymph nodes and skin have other cellular reactivities in

dc_1678_19

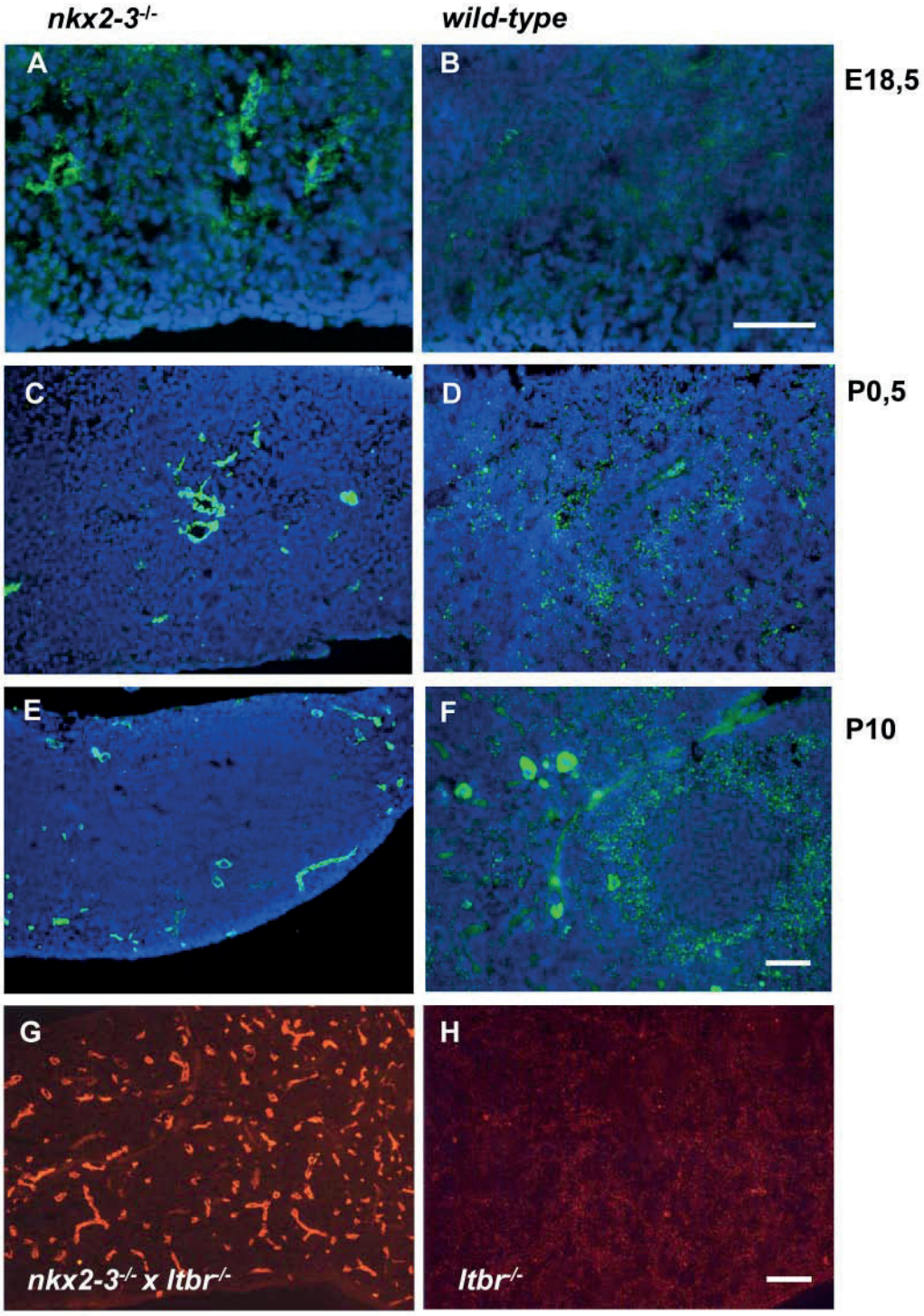


Figure 6. Formation of LYVE-1$^+$ structures and its independence from LTβR signaling. Late embryonic and early postnatal spleens (indicated on the left) from Nkx2-3–deficient mice (A, C, and E) contain LYVE-1$^+$ cells, compared with age-matched wild-type controls (B, D, and F, with DAPI counterstain). Spleens with combined mutation of Nkx2-3 and LTβR contain an increased number of LYVE-1 capillaries (G) compared with *ltbr*$^{-/-}$ mutants (H). The picture is representative of five mice per sample; the scale bar = 100 μm.

spleen. Thus we consider Prox1 as a cardinal LEC marker, and its absence together with that of VEGFR-3 suggests therefore that the postnatal persistence of LYVE-1$^+$ vessels is independent from the LEC commitment, so it probably represents the persistence of embryonic endothelium (Gordon et al. 2008), rather than the differentiation into

dc_1678_19

LEC-committed endothelia, in adult Nkx2-3 mutant spleens. However, the expression of VEGFR-2/flk1 confirms that these structures are composed of non-LEC endothelial cells. In contrast, cell tracing studies also suggest that these LYVE-1^+ cysts have only minimal exchange with either the systemic or lymphatic circulation. Although their formation is independent from the activity of LTβR, their increased number and capillary-like appearance in double mutants suggest some role for LTβR in their subsequent maturation.

The vascular malformations in human spleen are very rare and include various tumors and cysts (Kutok and Fletcher, 2003). The few reported cases of lymphatic endothelial cysts in human spleens do not correspond to the LYVE-1^+ structures in the Nkx2-3 mutants (Narita and Hizawa, 1995). In contrast, Nkx2-3 is also expressed in gut, and Nkx2-3 in humans has recently been associated with risk factors for inflammatory bowel diseases, although the underlying pathomechanism is still unknown (Franke et al. 2008; Parkes et al. 2007). It remains to be determined whether the formation of enteric lymphatic capillaries is also affected by the absence of Nkx2-3, similar to the reduction of Peyer's patches (Pabst et al. 2000; Wang et al. 2000). Nevertheless, our data raise the possibility that endothelial differentiation and maturation, including the early commitment from embryonic vessels, may be affected by perturbed expression of Nkx2-3, which may contribute to aberrant lymphoid neogenesis and immunological functions in these diseases (Drayton et al. 2006).

Acknowledgments

Supported by the Research Fund of the Faculty of Medicine and the SP Research Team Innovation grant No. SROP-4.2.2/08/1/2008-0011 University of Pécs (PB) and the Bolyai János Postdoctoral Fellowship of the Hungarian Academy of Sciences (TC). The authors gratefully acknowledge Dr. László Seress at the Central Electron Microscope Laboratory, University of Pécs, for performing ELMI analysis.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the authorship and publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research and authorship of this article.

References

Balázs M, Grama L, Balogh P. 1999. Detection of phenotypic heterogeneity within the murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies IBL-7/1 and IBL-7/22. Hybridoma. 18:177–182.

Balázs M, Horváth G, Grama L, Balogh P. 2001. Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. Cell Immunol. 212:126–137.

Balogh P, Bebök Z, Németh P. 1992. Cellular enzyme-linked immunocircle assay: a rapid assay of hybridomas produced against cell surface antigens. J Immunol Methods. 153:141–149.

Balogh P, Horváth G, Szakal AK. 2004. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. J Histochem Cytochem. 52:1287–1298.

Balogh P, Lábadi Á. 2011. Structural evolution of the spleen in man and mouse. In: Developmental Biology of Peripheral Lymphoid Organs. P Balogh, editor, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 121–141.

Balogh P, Balázs M, Czömpöly T, Weih DS, Arnold HH, Weih F. 2007. Distinct roles of lymphotoxin-beta signaling and the homeodomain transcription factor Nkx2.3 in the ontogeny of endothelial compartments in spleen. Cell Tissue Res. 328:473–486.

Bovári J, Czömpöly T, Olasz K, Arnold HH, Balogh P. 2007. Complex organizational defects of fibroblast architecture in the mouse spleen with Nkx2-3 homeodomain deficiency. Pathol Oncol Res. 13:227–235.

Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K, et al. 1999. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. Am J Pathol. 154:385–394.

Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN. 2007. Development and function of the mammalian spleen. Bioessays. 29:166–177.

Browning JL, Allaire N, Ngam-Ek A, Notidis E, Hunt J, Perrin S, Fava RA. 2005. Lymphotoxin-beta receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. Immunity. 23:539–550.

Czömpöly T, Lábadi Á, Kellermayer Z, Olasz K,Arnold HH,Balogh P. 2011. Transcription factor Nkx2-3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen. J Immunol, in press.

Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. 2006. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. Nat Immunol. 7:344–353.

Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Hedderich J, May S, Lu T, Schuldt D, Nikolaus S, Rosenstiel P, Krawczak M, et al. 2008. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. Nat Genet. 40:713–715.

Fütterer A, Mink K, Luz A, Kosco-Vilbois MH, Pfeffer K. 1998. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. Immunity. 9:59–70.

Giorno R. 1984. Unusual structure of human splenic sinusoids revealed by monoclonal antibodies. Histochemistry. 81:505–507.

Gordon EJ, Gale NW, Harvey NL. 2008. Expression of the hyaluronan receptor LYVE-1 is not restricted to the lymphatic vasculature; LYVE/1 is also expressed on embryonic blood vessels. Dev Dyn. 237:1901–1909.

dc_1678_19

Hou TZ, Bystrom J, Sherlock JP, Qureshi O, Parnell SM, Anderson G, Gilroy DW, Buckley CD. 2010. A distinct subset of podoplanin (gp38) expressing F4/80+ macrophages mediate phagocytosis and are induced following zymosan peritonitis. FEBS Lett. 584:3955–3961.

Kaipanen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. 1995. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. Proc Natl Acad Sci U S A. 92:3566–3570.

Kutok JL, Fletcher CD. 2003. Splenic vascular tumors. Semin Diagn Pathol. 20:128–139.

Kvell K, Czömpöly T, Pikkarainen T, Balogh P. 2006. Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 341:1193–1202.

Martinez-Pomares L, Hanitsch LG, Stillion R, Keshav S, Gordon S. 2005. Expression of mannose receptor and ligands for its cysteine-rich domain in venous sinuses of human spleen. Lab Invest. 85:1238–1249.

Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M, Van Rooijen N, Takenaka H, D'Amore PA, Stein-Streilein J, et al. 2005. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. J Clin Invest. 115:2363–2372.

Mebius RE, Kraal G. 2005. Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol. 5:606–616.

Narita T, Hizawa Y. 1995. Lymphangiomatous hamartoma of the spleen. Pathol Res Pract. 191:1165–1167.

Nolte MA, Hamann A, Kraal G, Mebius RE. 2002. The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. Immunology. 106:299–307.

Oliver G, Srinivasan RS. 2010. Endothelial cell plasticity: how to become and remain a lymphatic endothelial cell. Development. 137:363–372.

Pabst O, Zweigerdt R, Arnold HH. 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.

Pabst O, Förster R, Lipp M, Engel H, Arnold HH. 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.

Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, et al. 2007. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. Nat Genet. 39:830–832.

Pellas TC, Weiss L. 1990. Deep splenic lymphatic vessels in the mouse: a route of splenic exit for recirculating lymphocytes. Am J Anat. 187:347–354.

Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG. 2001. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. J Biol Chem. 276:19420–19430.

Schledzewski K, Falkowski M, Moldenhauer G, Metharom P, Kzhyshkowska J, Ganss R, Demory A, Falkowska-Hansen B, Kurzen H, Ugurel S, et al. 2006. Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. J Pathol. 209:67–77.

Stanfel MN, Moses KA, Schwartz RJ, Zimmer WE. 2005. Regulation of organ development by the NKX-homeodomain factors: an NKX code. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 51:OL785–799.

Steiniger B, Stachniss V, Schwarzbach H, Barth PJ. 2007. Phenotypic differences between red pulp capillary and sinusoidal endothelia help localizing the open splenic circulation in humans. Histochem Cell Biol. 128:391–398.

Vondenhoff MF, Desanti GE, Cupedo T, Bertrand JY, Cumano A, Kraal G, Mebius RE, Golub R. 2008. Separation of splenic red and white pulp occurs before birth in a LTalphabeta-independent manner. J Leukoc Biol. 84:152–161.

Vondenhoff MF, Greuter M, Goverse G, Elewaut D, Dewint P, Ware CF, Hoorweg K, Kraal G, Mebius RE. 2009. LTbetaR signaling induces cytokine expression and up-regulates lymphangiogenic factors in lymph node anlagen. J Immunol. 182:5439–5445.

Wang CC, Biben C, Robb L, Nassir F, Barnett L, Davidson NO, Koentgen F, Tarlinton D, Harvey RP. 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.

Wigle JT, Oliver G. 1999. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. Cell. 98:769–778.

Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, Jackson DG, Oliver G. 2002. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. EMBO J. 21:1505–1513.

dc_1678_19

The Journal of Immunology

Absence of Nkx2-3 Homeodomain Transcription Factor Reprograms the Endothelial Addressin Preference for Lymphocyte Homing in Peyer's Patches

Zoltán Kellermayer,*,†,[1] Martina Mihalj,‡,[1] Árpád Lábadi,* Tamás Czömpöly,§ Mike Lee,¶ Edward O'Hara,‖ Eugene C. Butcher,¶,‖,# Gergely Berta,** András Balogh,** Hans-Henning Arnold,†† and Péter Balogh*,†

Although the homing of lymphocytes to GALT has been extensively studied, little is known about how high endothelial venules (HEVs) within Peyer's patches (PPs) are patterned to display dominantly mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1). In this study, we report that Nkx2-3–deficient mice show gradual loss of MAdCAM-1 in PPs postnatally and increased levels of mRNA for peripheral lymph node addressin (PNAd) backbone proteins as well as enhanced expression of MECA79 sulfated glycoepitope at the luminal aspect of HEVs, thus replacing MAdCAM-1 with PNAd. Induction of PNAd in mutant PPs requires lymphotoxin β receptor activity, and its upregulation needs the presence of mature T and B cells. Furthermore, treatment with MECA-79 anti-PNAd mAb in vivo effectively blocks lymphocyte homing to mutant PPs. Despite the replacement of MAdCAM-1 by PNAd in HEV endothelia, lymphocytes could efficiently home to PPs in mutant mice. We conclude that although Nkx2-3 activity controls the addressin balance of HEVs in GALT, the general HEV functionality is preserved independently from Nkx2-3, indicating a substantial plasticity in the specification of GALT HEV endothelium. *The Journal of Immunology*, **2014, 193: 5284–5293.**

Lymphocyte homing to peripheral lymph nodes (pLNs) and GALT is initiated by the recognition of addressins within specialized high endothelial venules (HEVs). In pLNs L-selectin/CD62L on lymphoid cells recognizes the carbohydrate ligand peripheral node addressin (PNAd) (1, 2), whereas homing to Peyer's patches (PPs) is initiated by the binding of $\alpha_4\beta_7$ integrin on leukocytes to mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) on endothelial cells (3–8). In mesenteric LNs (mLNs) a combined mechanism operates by which MAdCAM-1 and PNAd, both expressed on HEVs, serve as endothelial receptors for extravasation (9). Subsequently, engagement of chemokine receptors CCR7 and CXCR5 and their respective CCL21 and CXCL13 ligands is required for the promotion of integrin-mediated firm adhesion of T and B lymphocytes (10–12). Thus, the local specialization of vasculature, including the restricted expression of addressin molecules and chemokines by endothelial cells, critically determines lymphocyte homing to secondary lymphoid tissues. Despite detailed knowledge of the interaction cascade during leukocyte extravasation, however, relatively little is known about the microenvironmental determinants that lead to the diversity of vasculature among the peripheral lymphoid organs.

Establishment of lymphoid microvasculature is an important event during organogenesis of secondary lymphoid tissues, which is controlled by several morphogenic determinants. Members of the lymphotoxin (LT)/TNF family and their receptors influence the formation of several peripheral lymphoid tissues throughout the organism, whereas additional factors, including the Nkx2-3 homeodomain-containing transcription factor, act in a more tissue-specific manner (13). This tissue specificity may reflect the developmental expression of Nkx2-3 restricted to the intestines, spleen, and other tissues associated with the pharyngeal part of the gastrointestinal tract, such as teeth, salivary glands, and tongue (14).

Previous studies in mice have revealed important roles of Nkx2-3 in the development of spleen and PPs through the control

*Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; †Lymphoid Organogenesis Research Group, Szentágothai János Research Center, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; ‡Department of Physiology and Immunology, University of Osijek, 31000 Osijek, Croatia; §Cancer Research and Product Development Laboratory, Immunal Ltd., H-7630 Pécs, Hungary; ¶Laboratory of Immunology and Vascular Biology, Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305; ‖Palo Alto Veterans Institute for Research, Palo Alto, CA 94304; #Center for Molecular Biology and Medicine, Veterans Affairs Palo Alto Health Care System, Palo Alto, CA 94304; **Department of Medical Biology, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary; and ††Department of Cell and Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Biotechnology, Technical University of Braunschweig, 38106 Braunschweig, Germany

[1]Z.K. and M.M. contributed equally to this work.

Received for publication August 7, 2014. Accepted for publication September 11, 2014.

This work was supported by Hungarian Scientific Research Fund Grants SROP-4.2.2/B-10/1-2010-0029 and HUHR/1001/2.1.3/0007 (CABCOS II project) at the University of Pécs. Z.K. is supported by the Apáczai Csere János Fellowship in the framework of Social Renewal Operational Programme 4.2.4. A/1-11-1-2012-0001 "National Excellence Program." M.L. is a recipient of a senior fellowship from the Crohn's and Colitis Foundation and was a fellow under National Institutes of Health Training Grant AI07290. E.C.B. received support from National Institutes of Health Grants R37 AI047822, P30 DK056339, and R01 DK084647 as well as from the U.S. Department of Veterans Affairs. P.B. is supported by Hungarian Scientific Research Fund Grant OTKA K108429 and is a recipient of Research Grant IBD-0341 from the Broad Medical Research Program of the Eli and Edythe Broad Foundation.

Z.K., M.M., and P. B. performed the adoptive cell transfer experiments, flow cytometric analyses, immunofluorescence, and quantitative PCR tests; Á.L. and T. C. contributed to genotyping and quantitative PCR data analyses; G.B. and A.B. operated the confocal microscope; M.L. and E.O. provided conjugated anti-PNAd Ab and methods, as well as input on the manuscript; E.C.B. and H.-H.A. helped analyze data and edited the manuscript during its preparation; and P.B. and Z.K. wrote the manuscript.

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

Abbreviations used in this article: HEV, high endothelial venule; KO, knockout; LN, lymph node; LT, lymphotoxin; LTβR, lymphotoxin-β receptor; MAdCAM-1, mucosal addressin cell adhesion molecule 1; mLN, mesenteric LN; P, postnatal day; P0.5, <1-d-old neonate; pLN, peripheral LN; PNAd, peripheral LN addressin; PP, Peyer's patch; Treg, regulatory T cell.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1402016

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

of the endothelial expression of MAdCAM-1 but not in the formation of pLNs. Nkx2-3 transcripts are expressed in PPs and mLNs but only marginally in pLN high endothelial cells (15), and they thus are likely to act cell-intrinsically within HEVs to regulate MAdCAM-1 expression, although indirect effects through stromal or epithelial cell signals are not excluded. In spleen the absence of Nkx2-3 causes severe structural alterations of the marginal zone, follicles (16, 17), and the pattern of vasculature particularly affecting the red pulp (18). Our previous work in Nkx2-3–deficient mice revealed a complete shift of splenic vasculature to the pLN-like pattern, including PNAd$^+$ HEVs mediating L-selectin–dependent homing of lymphocytes, and sac-like structures expressing LYVE-1 lymphatic endothelium-associated marker (19, 20).

In addition to the altered vasculature in spleen, PPs and mLNs in adult mice with disrupted Nkx2-3 also lack HEV-associated MAdCAM-1 expression (17, 21). As the lymphocyte homing to PPs in wild-type mice requires MAdCAM-1 display by HEVs, this lack of MAdCAM-1 from mutant PP HEVs suggests the involvement of alternative adhesion processes allowing the local homing, perhaps at a lesser efficiency, as indicated by the reduction in the number and size of mutant PPs. Importantly, the molecular components that mediate homing to PPs without endothelial MAdCAM-1 in mice deficient for Nkx2-3 have not been identified.

Further significance of Nkx2-3–regulated gene expression has been suggested in humans, where alterations in Nkx2-3 expression and sequence variations have been associated with the occurrence of Crohn's disease and ulcerative colitis, two frequent forms of chronic inflammatory illnesses of the gut associated with autoantibody production and excessive intestinal accumulation of leukocytes (22, 23).

In the present work we investigated the addressin signature and functional characteristics of HEVs in Nkx2-3–deficient mice, and also its effect on homing of recirculating lymphocytes to PPs. Our results indicate that MAdCAM-1 is largely replaced by PNAd in HEVs of PPs in a process reminiscent of postnatal maturation of HEVs in pLNs. These observations thus support the view that, similarly to the spleen, Nkx2-3 acts as a repressor of pLN-like vascular patterning also in GALT. Thus, the capacity of mucosal HEVs to upregulate PNAd in the absence of Nkx2-3 reveals a remarkable endothelial plasticity of addressin display to preserve HEV functionality.

Materials and Methods

Mice

Generation of *Nkx2-3*$^{-/-}$ mice on the BALB/c genetic background was described previously (19). For homing studies, GFP-BALB/c mice (24) from the specific pathogen-free breeding unit of the Medical Faculty of the University of Pécs were used as lymphocyte donors for adoptive transfer. Nkx2-3 × Rag1 double-deficient mutants were bred using RAG-1 knockout (KO) mice (25) purchased from The Jackson Laboratory. LT β receptor (LTβR)–Ig fusion protein was provided by Dr. Jeff L. Browning (Biogen Idec, Cambridge, MA) and was injected in newborn Nkx2-3 KO mice as previously described (19). All procedures involving live animals were carried out in accordance with the guidelines set out by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of Pécs (Pécs, Hungary).

Abs and reagents

For immunohistology, rat mAbs against MAdCAM-1 (clone MECA-367), PNAd (clone MECA-79), and VCAM-1 (clone 429) were purchased from BD Biosciences (Soft Flow, Pécs, Hungary); anti–ICAM-1 (clone YN/1) Ab was used as hybridoma supernatant (obtained from the American Type Culture Collection). Endothelial cells were identified by anti-mouse VEGF-R2/flk-1 mAb (clone Avas12α1) from BD Biosciences (Soft Flow). For in vivo visualization, anti-MAdCAM-1–FITC and anti-PNAd–Dylight 594 mAb conjugates were produced. Adoptively transferred CFSE-labeled lymphocytes were correlated with recipient leukocytes using IBL-5/25 anti-CD45 mAb followed by PE-conjugated anti-rat IgG. For multicolor labeling, anti-B220 mAb (from clone RA3-6B2) was conjugated with Alexa Fluor 647 (Life Technologies, Budapest, Hungary). Lymphocyte subsets were identified using anti-B220 Alexa Fluor 647, anti-CD3 FITC, and anti-CD8 PE-Cy5 from BD Biosciences (Soft Flow). For detection of addressin ligands on leukocytes, biotinylated MEL-14 mAb against L-selectin and PS/2 mAb against α_4 integrin was used. Secondary goat anti-rat IgG conjugated with FITC or PE was obtained from BD Biosciences (Soft Flow). Goat Abs against murine CXCL13 and CCL21 chemokines and NorthernLights 557–conjugated donkey Ab against goat IgG were obtained from R&D Systems (Biomedica Hungary, Budapest, Hungary).

Immunofluorescence

Single, dual, and multiple immunofluorescent staining of frozen and acetone-fixed sections prepared from PPs or LNs were performed as described earlier (26). For control staining, normal rat IgG at 10 μg/ml concentration was used. Sections were viewed using an Olympus FluoView FV-1000 laser scanning confocal imaging system (Olympus, Center Valley, PA). For the luminal expression of MAdCAM-1 and PNAd, a mixture containing 150 μl of both anti-PNAd–Dylight 594 and anti-MAdCAM-1-FITC at 0.5 mg/ml was injected i.v. to wild-type BALB/c or Nkx2-3$^{-/-}$ mice, which were sacrificed 30 min later. For quantification, the samples were visualized using a ×20 dry objective (UPLSAPO series; numerical aperture, 0.75) at a 80-μm-wide confocal aperture in photon count mode, excited with multiline argon and helium-neon lasers for 10 μs/pixel in sequential mode creating 1024 × 1024-pixel single-layer confocal images. Total pixel intensity of the images was determined by Fv10-ASW 01.07.03.00 software (Olympus).

Flow cytometry

Lymphoid organs were gently teased apart between the frosted ends of microscope slides and resuspended in PBS containing 0.1% sodium azide and 0.1% BSA. For defining the degree of homing of CFSE-labeled lymphocytes, the cell suspension was incubated with IBL-5/25 rat mAb as hybridoma supernatant against mouse CD45 (produced in our laboratory) on ice for 20 min, followed by washing and visualization using PE-conjugated goat anti-rat IgG by 20 min incubation on ice. L-selectin and α_4 integrin expression was detected using biotinylated MEL-14 in conjunction with streptavidin-PE Cy5.5 and PS/2 mAbs, respectively. CD4$^+$ memory T cells were identified using anti–CD44-FITC and biotinylated MEL-14 in conjunction with streptavidin-PE Cy5.5 and anti-CD4–Alexa Fluor 647 labeling. Regulatory T cells (Tregs) were labeled by anti–CD3-FITC, anti–Foxp3-PE and anti–CD25-PerCP from BD Biosciences (Soft Flow) and anti-CD4–Alexa Fluor 647 staining. After washing, the cells were fixed in 1% buffered paraformaldehyde. At least 20,000 events of forward scatter/side scatter–gated lymphocytes were collected by a BD Biosciences FACSCalibur cytometer and analyzed using CellQuest software.

Adoptive transfer and lymphocyte migration assay

Donor lymphocytes were isolated from pLNs and spleen of BALB/c mice and labeled with CFSE (Invitrogen, Budapest, Hungary) as described previously (27) or from GFP-BALB/c donor mice. Recipient mice received 10^7 cells per 200 μl i.v. via the tail veins. Mice were sacrificed at 30, 60, and 120 min after injection. Leukocytes from spleen, pLNs, mLNs, and PPs were isolated for flow cytometry. Three mice were used in each group.

In vivo blocking of lymphocyte homing

To block lymphocyte homing, recipient mice were injected with 100 μg anti-endothelial mAbs, followed 30 min later by injection of 5 × 10^7 lymphocytes from GFP transgenic spleens and pLNs (28). Recipient mice were sacrificed 1 h after the lymphocyte injection, and cells from spleen, pLNs, mLNs, and PPs were isolated for flow cytometry. Donor lymphocytes were identified by flow cytometry. At least 20,000 live cells were collected by a BD Biosciences FACSCalibur cytometer and analyzed using CellQuest software.

Real-time PCR

Total RNA was isolated with an RNeasy Plus mini kit (Qiagen) and was treated with DNase I (Sigma-Aldrich). cDNA was prepared with the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR primers used for real-time quantitative amplification of Glycam1, Madcam1, Cd34, endomucin, Cd300lg (nepmucin), podocalyxin-like protein, Gcnt1, Chst2, Chst4, and Fut7 were described previously (19). PCR primers for Icam1 (forward, 5′-CAGTCCGCTGTGCTTTGAGA-3′, reverse, 5′-CGGAAA-CGAATACACGGTGAT-3′) were designed by Primer Express software (Applied Biosystems). PCRs were run in triplicates using the Power SYBR

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

Green Master Mix (Applied Biosystems) on an ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems). Standard curves were generated for each transcript, and expression levels were normalized to β-actin; the relative expressions were calculated using β-actin–normalized expression levels of wild-type PPs as reference samples.

Statistical analysis

Data analysis was performed using SigmaPlot software (version 11.0; Systat Software, San Jose, CA), and the graphs were created with the help of GraphPad Prism (version 5; GraphPad Software, La Jolla, CA). A Shapiro–Wilks test was performed to assess normality of data distribution. Between-group analysis for normally distributed variables was tested using a parametric one-way ANOVA and a post hoc Tukey test, whereas in the case of variables that violated assumption of normality, differences were tested with a nonparametric Kruskal–Wallis test followed by pairwise multiple comparison procedures (Dunn test and Student–Newman–Keuls method). A *t* test or Mann–Whitney *U* test were employed to compare two groups with normally and non-normally distributed data, respectively. Data are presented as means ± SEM. Quantitative real-time PCR data were analyzed with the help of REST 2009 software (version 2.0.13; Qiagen, Hilden, Germany). Accepted statistical significance was for $p < 0.05$.

Results

Altered mRNA expression of HEV signature genes associated with pLN-type HEV specification in GALT of adult Nkx2-3$^{-/-}$ mutant mice

In agreement with previous reports describing the presence of hypoplastic PPs in other strains deficient for Nkx2-3 (17, 21), we observed that lack of endothelium-associated MAdCAM-1 in Nkx2-3$^{-/-}$ mice on the BALB/c background does not prevent the formation of PPs and the accumulation of lymphocytes. As we have previously shown that ectopic PNAd^{+} HEVs appear in mutant spleen (19), we hypothesized that in PP HEVs MAdCAM-1 may also be replaced by PNAd.

PNAd represents a set of complex carbohydrate determinants recognized by MECA-79 mAb, requiring sequential glycosylation modifications on several backbone proteins to be recognized by L-selectin expressed on leukocytes (2). Potential backbone proteins are GlyCAM-1, CD34, podocalyxin, endomucin, nepmucin, and also MAdCAM-1, whereas the most important modifications include sialylation, fucosylation, and carbohydrate sulfation and are performed by a variety of fucosyltransferases and sulfotransferases. We recently reported that the formation of ectopic splenic HEVs in Nkx2-3–deficient mice is associated with a robust increase of protein backbone GlyCAM-1 mRNA and, to a lesser degree, various other mRNAs for modifying enzymes as well (19). To examine the expression pattern of these mRNAs in mutant and wild-type PPs, we performed real-time PCR for Madcam1, Glycam1, Cd34, Emcn (coding endomucin), Cd300lg (nepmucin), and Podxl (podocalyxin-like) as well as for the modifying enzymes Gcnt1 (glucosaminyl [*N*-acetyl] transferase 1, core 2), Chst2 (carbohydrate [*N*-acetylglucosamine 6-*O*] sulfotransferase 2), Chst4 (carbohydrate [*N*-acetylglucosamine 6-*O*] sulfotransferase 4), and Fut7 (fucosyltransferase 7), and compared their levels to those in wild-type PPs, with value defined as 1 (Fig. 1). We found that the core protein mRNAs showed variable increases, with endomucin showing the highest increase. Surprisingly, Madcam1 mRNA in mutant PPs also showed a statistically significant increase (PPs), despite the nearly complete absence of endothelial MAdCAM-1 previously reported. ICAM-1 mRNA showed a slight reduction in Nkx2-3 KO PPs.

Analysis of the modifying enzymes also revealed variable alterations of mRNA expression. The glycosyltransferase Gcnt1 did not change significantly, and of the two sulfotransferases the mRNA for Chst2 was reduced, whereas Chst4, a key enzyme for sulfation of MECA-79 epitope in pLNs, showed a 4-fold increase in mutant PPs. Fucosyltransferase Fut7 in mutant PPs was also elevated compared with wild-type PPs.

Overall, these deviations indicate that the vasculature of KO PPs undergoes a shift toward pLN-like vasculature, similarly to mLNs and spleen as reported earlier (19). However, this shift more likely corresponds to a variation of existing HEV characteristics, rather than their ectopic induction.

Characterization of HEV endothelium and lymphocyte composition in the GALT of Nkx2-3 $^{-/-}$ mice

Next we tested whether the PNAd epitope is present on the HEVs of Nkx2-3–deficient PPs. We first stained PP tissue sections from young adult (8 wk old) mutants and wild-type age-matched controls for VEGF-R2 to determine the degree of vascularization. We found no significant differences between the vascular pattern of wild-type and control samples in either tissue (Fig. 2A). For HEV addressin profiling, we labeled the sections with anti–MAdCAM-1 and anti-PNAd mAbs. With anti–MAdCAM-1 mAb in mutant mice no vascular staining was observed, except for occasional weak perivascular reactivity. In contrast, HEVs in PPs of wild-type mice were intensely labeled with anti–MAdCAM-1 mAb. In

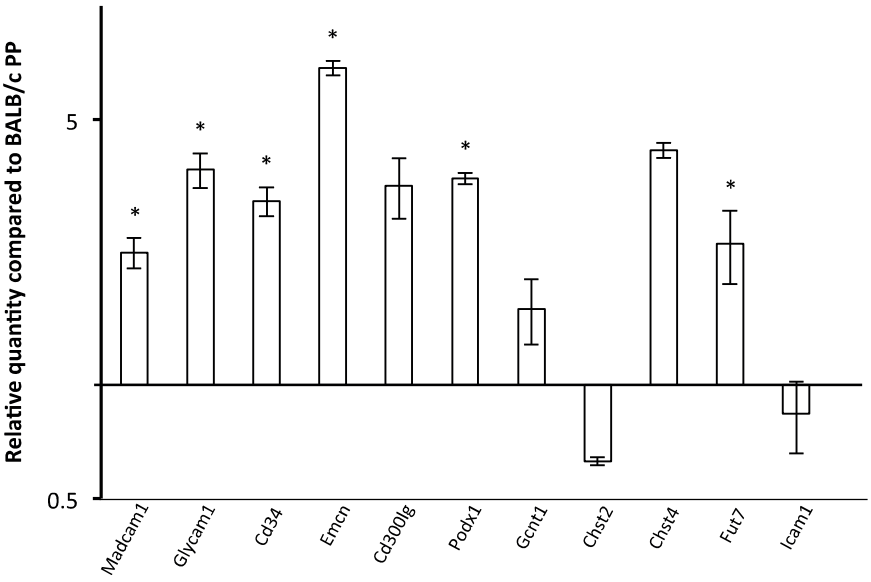


FIGURE 1. Increased mRNA levels of PNAd core proteins and modifying enzymes in mutant PPs. mRNA levels for PNAd core proteins and modifying enzymes were measured in mutant and wild-type PPs. Compared with wild type mice, Nkx2-3–deficient PPs express significantly increased levels of various PNAd backbone proteins (Glycam, CD34, endomucin, podocalyxin-like protein). Modifying enzyme levels show a moderate increase with only fucosyl transferase being significant. Values are normalized to the ratio of target mRNA to β-actin in the wild-type PPs, represented by the line drawn at $y = 1$ and are expressed on a log scale. Bar diagrams show means ± SEM, $n \geq 3$ animals. *$p < 0.05$.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

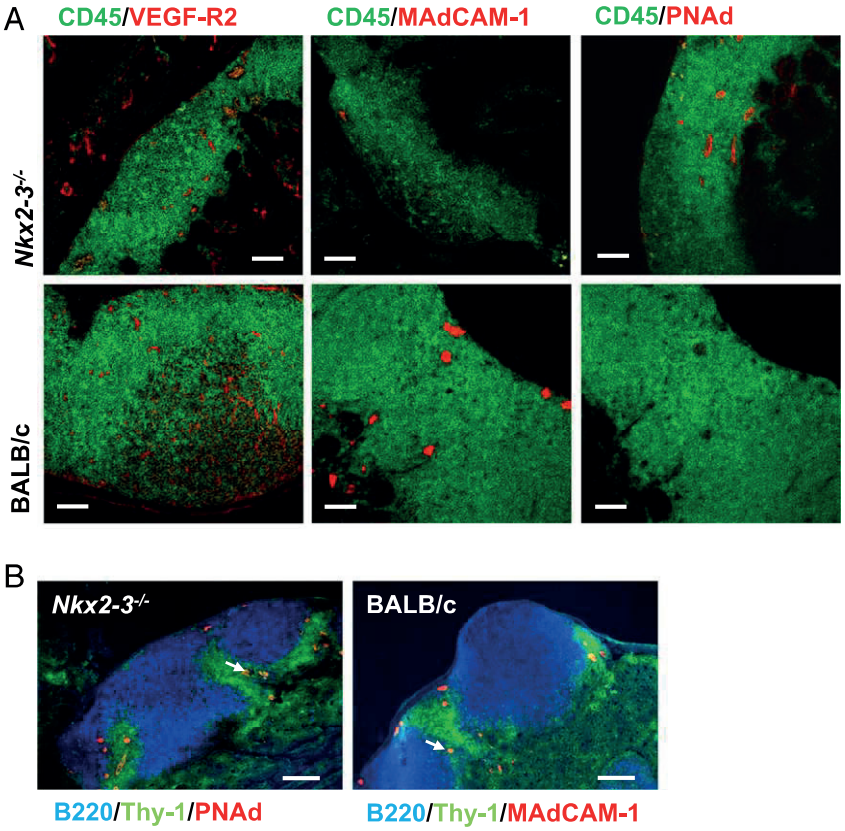


FIGURE 2. Addressin profile and distribution of PP HEVs of Nkx2-3–deficient mice. (**A**) Cryostat tissue sections were stained as indicated. Anti–VEGF-R2 labeling (*left*) reveals normal vascularization in Nkx2-3$^{-/-}$ PPs. However, whereas MAdCAM-1 is present in wild-type PPs (*middle*), it shows only scarce endothelial expression in mutant tissues. On the contrary, PNAd is rarely expressed in normal PPs but is upregulated in Nkx2-3–deficient PP HEVs (*right*; representative samples from five animals per group). Scale bars, 100 μm. (**B**) Tissue sections stained as indicated show that the HEVs in *Nkx2-3*$^{-/-}$ PPs (*left*) are preferentially located in the T cell zone, similarly to wild-type samples with MAdCAM-1^{+} HEVs (*right*). Arrows point to HEV cross-sections. Scale bars, 200 μm. Results are representative of three different experiments with at least three mice.

a reverse pattern, in wild-type PPs with the anti-PNAd mAb MECA-79 we found only weak staining, whereas PPs of mutant mice showed significantly enhanced PNAd reactivity. Costaining sections with anti–Thy-1 and anti-B220 mAbs revealed that the aberrant PNAd^{+} HEVs are mostly found in the T cell zone of mutant PPs (Fig. 2B). This distribution of HEVs is similar to wild-

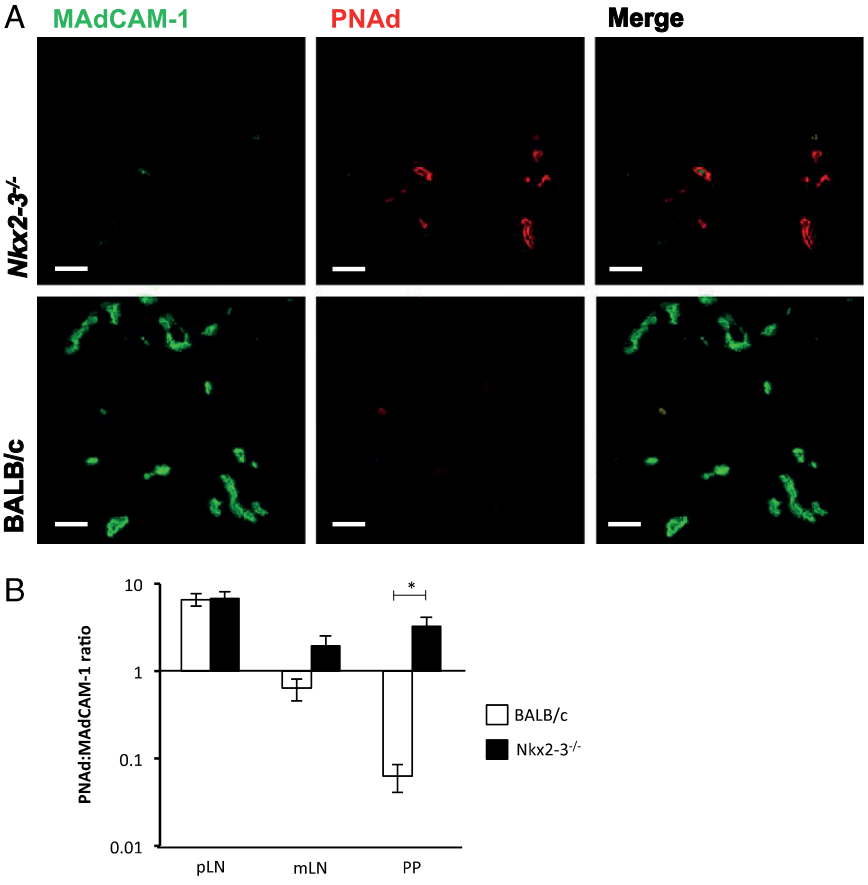


FIGURE 3. PNAd is luminally expressed in mutant PPs. (**A**) Intravenously injected FITC-conjugated MECA-367 binds to luminal MAdCAM-1 in wild-type PPs whereas it shows minimal labeling in Nkx2-3–deficient PPs. Binding of DyLight-594–conjugated MECA-79 indicates that the PNAd epitope is expressed luminally in Nkx2-3 mutant PPs. (**B**) Photon count analysis shows that the PNAd/MAdCAM-1 ratio significantly increases in mutant PPs. Bar graph shows means ± SEM, $n \geq 3$. *$p < 0.05$. Results are representative of three different experiments with at least three mice. Scale bar, 100 μm.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

type tissues. Mutant sections labeled for VCAM-1 and ICAM-1 revealed no difference in comparison with normal mice (not shown).

For testing the luminal expression of PNAd epitope of HEVs, we injected i.v. a mixture of MECA-79 labeled with DyLight 594 and FITC-conjugated anti–MAdCAM-1 mAbs and compared the reactivities to wild-type mice. HEVs in PPs of the mutant mice showed strong luminal PNAd expression, with occasional MAdCAM-1 reactivity. In contrast, in wild-type PPs strong luminal MAdCAM-1 reactivity was observed, whereas the PNAd expression appeared weak (Fig. 3A). We quantified the PNAd/MAdCAM-1 expression ratios in PPs using photon count measurement with confocal microscopy and compared their ratio to those in pLNs and mLNs. In mutant PPs the mean PNAd/MAdCAM-1 ratio was 3.26, significantly higher than that measured in wild-type PPs (mean ratio, 0.06; $p = 0.026$). Although the PNAd/MAdCAM-1 ratio of mutant PPs was less than in either wild-type or Nkx2-3–deficient pLNs, this difference was not significant statistically. Although we found a marked increase in the PNAd/MAdCAM-1 ratio in Nkx2-3 KO mLNs compared with normal control samples (1.94 versus 0.64, $p = 0.52$), it was also not different statistically (Fig. 3B).

In addition to homing receptors on HEVs, lymphocyte homing to PPs also requires recognition of CCL21 and CXCL13 arrest chemokines present on endothelium in T zone and follicle-associated HEVs, respectively (10–12). Using immunofluorescent labeling, both CCL21 and CXCL13 were detected in PP HEVs of mutant mice (Fig. 4). Collectively, these data suggest that in the absence of Nkx2-3, MAdCAM-1 is largely replaced by PNAd in HEVs of PPs, but the HEV endothelial cells retain those chemokines that promote lymphocyte homing.

To test whether the altered addressin profile would affect the PP lymphocyte composition in Nkx2-3$^{-/-}$ mice, we analyzed lymphoid cells. Staining with anti-CD3 and anti-B220 revealed that the pLN-like vascular profile of mutant PPs is associated with a somewhat higher rate of T cells and a significantly lower rate of B cells compared with wild-type PPs (Fig. 5A). Detailed analysis of the CD4$^+$ T helper lineage subsets revealed no difference in the memory (CD44^{hi}Lsel^{lo}) and naive (CD44^{lo}Lsel^{hi}) T cell numbers and the follicular helper T cell population (CD4$^+$CXCR5$^+$PD1$^+$; Fig. 5B, 5C). However, Tregs with CD25^{hi}Foxp3$^+$ characteristics were significantly higher in Nkx2-3–deficient PPs compared with normal tissues ($p = 0.009$; Fig. 5D). In agreement with the enhanced PNAd expression by PP HEVs in Nkx2-3 mutant mice, we observed increased L-selectin expression of PP lymphocytes (Fig. 5E).

PNAd$^+$ HEVs in Nkx2-3$^{-/-}$ GALT are fully functional exit ports in lymphocyte homing

To investigate whether MAdCAM-1 replacement by PNAd in GALT HEVs affects lymphocyte recirculation, we examined

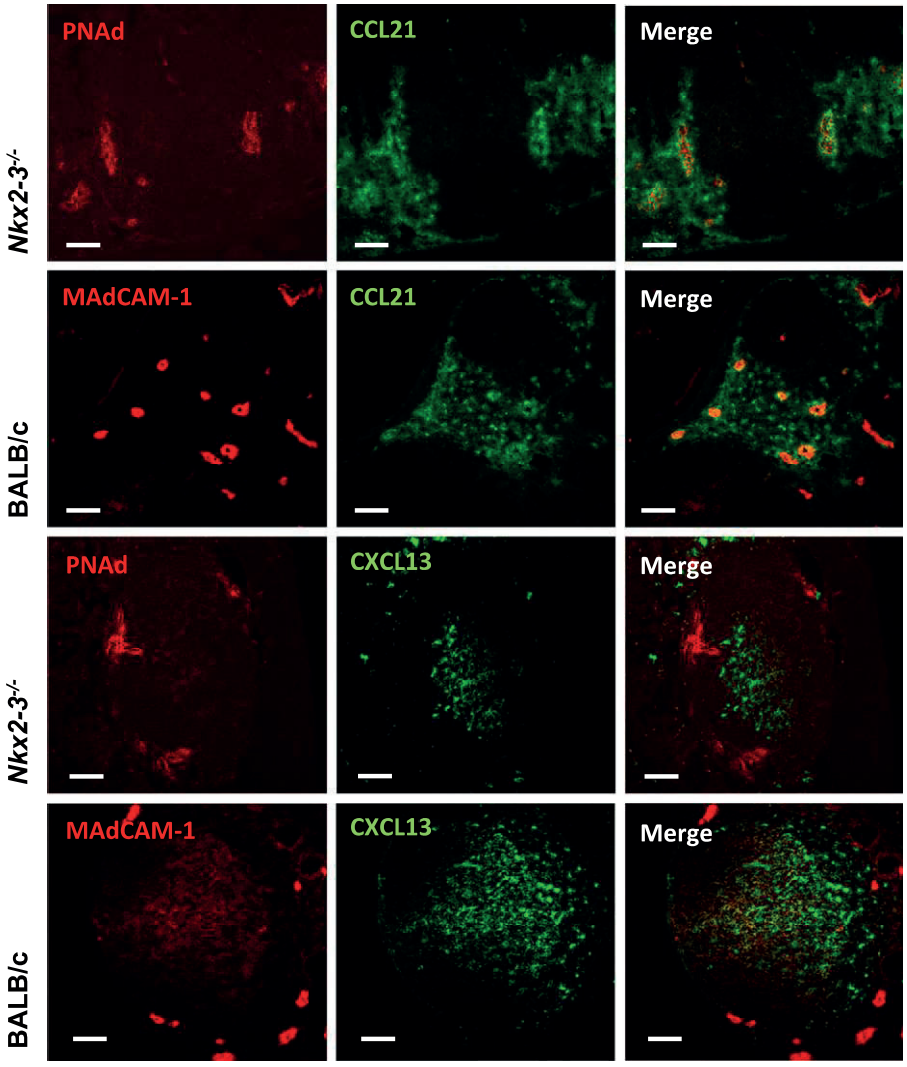


FIGURE 4. Mutant PPs show normal tissue distribution of homeostatic chemokines. Wild-type and mutant PP sections were double stained with anti-PNAd or anti–MAdCAM-1 mAbs and either anti-CCL21 or anti-CXCL13 Abs, respectively. In wild-type tissues CCL21 chemokine is expressed along the MAdCAM-1$^+$ HEVs, whereas in mutant tissues the chemokine is associated with PNAd$^+$ HEVs. CXCL13 in both samples is restricted to nonvascular stromal elements. Results are representative of three different experiments with at least three mice. Scale bars, 100 μm.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

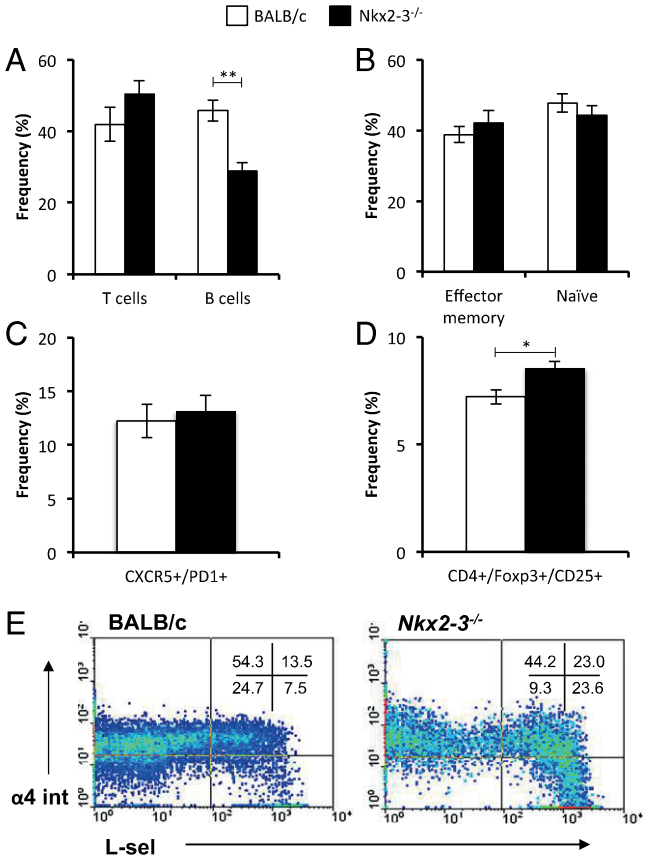


FIGURE 5. Lymphocyte composition of PPs. Nkx2-3–deficient PPs contain more T cells and significantly less B cells compared with BALB/c mice (**A**). The frequency of follicular helper T cells (**B**) and the memory status of $CD4^+$ cells (**C**) are not affected in mutant PPs. Tregs show a significant increase in Nkx2-3 KO PPs (**D**). L-selectin expression is increased on lymphocytes from mutant PPs (**E**). Bar diagrams show means ± SEM with $n \geq 5$ mice. $*p < 0.05$, $**p < 0.001$.

homing of lymphocytes to PPs using immunofluorescence and flow cytometric analysis.

For in situ immunofluorescence, CFSE-labeled wild-type lymphocytes were injected i.v. into wild-type and Nkx2-3 mutant mice, and the recipients were sacrificed 30, 60, and 120 min after injection. We found that CFSE-labeled lymphocytes in Nkx2-3–deficient mice efficiently recognized the $PNAd^+$ HEVs, whereas $CFSE^+$ cells in wild-type recipients localized to $MAdCAM\text{-}1^+$ HEVs in PPs (Fig. 6A). More careful inspection of the position of labeled lymphocytes revealed that, in mutant mice, most CFSE-labeled cells were located in the immediate vicinity of HEVs, whereas in wild-type mice a substantial fraction of cells migrated into deeper segments of the PPs. Cell count analysis established that in mutant PPs a significantly higher number of $CFSE^+$ cells are associated with $VEGF\text{-}R2^+$ vessels (either within the vessels or immediately adjacent) compared with wild-type tissues ($p = 0.001$). As time progresses, this number decreases in PPs as lymphocytes leave the vicinity of vessels. However, the difference between wild-type and mutant PPs increases, indicating that lymphocytes in mutant PPs cross the HEV endothelium at a significantly slower pace (Fig. 6B).

To determine the degree of homing of various lymphoid subsets, we next adoptively transferred GFP^+ tracer lymphocytes into either Nkx2-3–deficient or wild-type recipients, followed by staining PP cells with anti-CD4, anti-CD8, and anti-B220 mAbs. Although the injected cells contained approximately equal numbers of B cells, $CD4^+$ cells, and $CD8^+$ T cells (B220, 27.85%; CD4, 37.33%, CD8, 21.68%), intriguingly we found a significant shift toward preferential T cell entry among donor GFP^+ cells into PPs in both types of recipients. At 1 h postinjection we found that in wild-type PPs the donor $B220^+$ cells represented ~7.9% of GFP^+ (donor) cells within the organ, whereas in mutant recipients this number was significantly lower (1.9% of GFP^+ cells). Alternatively, the number of homed GFP^+ $CD8^+$ T cells was significantly higher in mutant PPs compared with BALB/c PPs (24.4 versus 15.3%, $p = 0.003$). The $CD4^+$ T cells represented the absolute majority of lymphocytes entering the PPs in both wild-type and Nkx2-3 mutants (72.2 and 70.3%, respectively; Fig. 6C).

In vivo blockade of PP homing by anti-PNAd mAb

To ascertain the in vivo functional replacement of MAdCAM-1 by PNAd in GALT HEVs of Nkx2-3–deficient mice, next we applied mAbs against PNAd or MAdCAM-1 addressins and also a combined anti-PNAd × anti–MAdCAM-1 treatment to block interactions with their natural ligands, followed by the injection of GFP-expressing tracer lymphocytes. Relative inhibitions in various peripheral lymphoid organs of mutant and wild-type mice were compared.

In spleen of wild-type mice, anti–MAdCAM-1 and anti-PNAd Abs had no significant effect on lymphocyte homing. In contrast, homing of lymphocytes to Nkx2-3–deficient spleen was significantly reduced by MECA-79 anti-PNAd mAb. This observation is in agreement with our previous finding that L-selectin has a prominent role in lymphocyte homing to ectopic splenic HEVs in the mutant (19).

Lymphocyte homing to mutant and wild-type pLNs was effectively inhibited by anti-PNAd mAb MECA-79, although this inhibition was slightly weaker in mutant pLNs. Anti–MAdCAM-1 mAb had no effect on homing in either wild-type or mutant pLNs.

In mLNs lymphocyte homing was significantly reduced by anti-PNAd and anti–MAdCAM-1 mAbs in wild-type recipients, with anti-PNAd mAbs exerting stronger inhibition. In contrast, lymphocyte homing to mutant mLNs was inhibited only by anti-PNAd mAb treatment, consistent with the absence of endothelial MAdCAM-1 from GALT HEVs.

Treatment of wild-type mice with anti–MAdCAM-1 mAb resulted in a significant reduction of homing to PPs, whereas application of anti-PNAd mAb had no effect. In contrast, in $Nkx2\text{-}3^{-/-}$ PPs anti–MAdCAM-1 treatment had no effect, whereas administration of anti-PNAd mAb significantly ($p < 0.05$) reduced homing of donor lymphocytes to mutant PPs. However, inhibition of lymphocyte homing to mutant PPs by anti-PNAd treatment was less pronounced than was the inhibitory effect of anti–MAdCAM-1 treatment in wild-type mice, and also the degree of homing blockade to mutant PPs by anti-PNAd mAb treatment was not as efficient as in either wild-type or mutant pLNs. Combining anti–MAdCAM-1 mAb with anti-PNAd failed to further increase the inhibition of homing to mutant and wild-type PPs (Fig. 7).

The postnatal switch of MAdCAM-1 to PNAd in $Nkx2\text{-}3^{-/-}$ GALT requires lymphotoxin signaling and is enhanced in the presence of mature T and B cells

Previous data on the maturation of HEVs indicated that postnatally HEVs in murine pLNs display MAdCAM-1, which is gradually replaced by PNAd during the first postnatal month (29). This process coincides with the colonization of developing LNs with T and B lymphocytes, and it requires signaling through LTβR expressed on endothelial cells (30, 31). Given the pLN-like shift of lymphocyte composition and endothelial addressin expression in Nkx2-3 mutant PPs, we next investigated the lymphoid cellular and LT requirements of this process.

First we examined the time period during which the expression of MAdCAM-1 shifts to PNAd in PPs of mutant mice and the

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

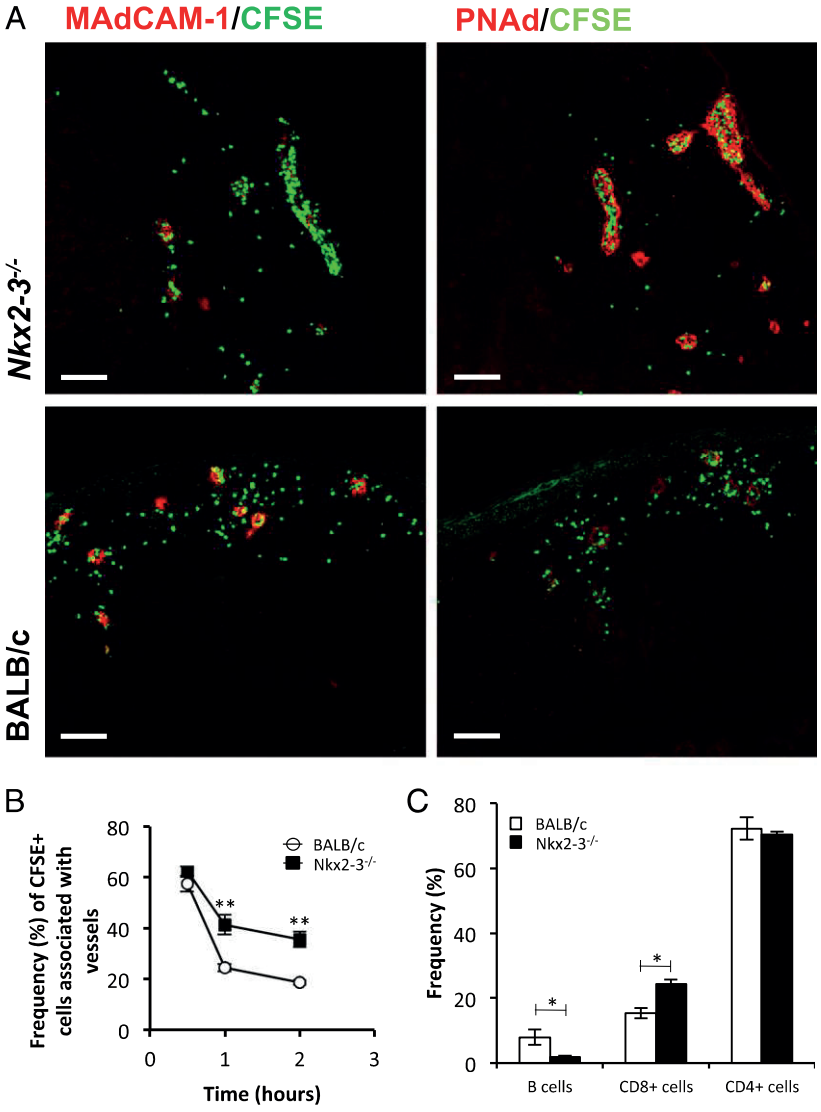


FIGURE 6. Cell transfer into mutant and wild-type PPs. CFSE-labeled lymphocytes were injected i.v. as described. The transferred lymphocytes localize to MAdCAM-1 HEVs in wild-type PPs whereas they adhere to PNAd$^+$ vessels in mutant tissues (**A**; $n = 6$; scale bars, 100 μm). In Nkx2-3$^{-/-}$ PPs the CFSE$^+$ cells migrate across HEVs at a significantly slower pace than in wild-type mice (**B**). The overwhelming majority of transferred cells in both genotypes are CD4$^+$ cells, whereas the rate of B cells is significantly lower and the CD8$^+$ cells are significantly increased in mutant PPs compared with wild-type (**C**). $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.001$.

impact of lymphocyte presence. Gut sections from newborn (<1-d-old neonates [P0.5]), 1-wk-old, and 2-wk-old mice were immunostained with anti-CD45, anti–MAdCAM-1, and anti-PNAd mAbs. We found that at P0.5 both wild-type and mutant mice express MAdCAM-1 in immature PPs, whereas no PNAd was detected in either sample. By the first postnatal week, PNAd appears in Nkx2-3–deficient PPs whereas MAdCAM-1 still persists, frequently colocalizing with PNAd. Two weeks after birth most HEVs stain only with MECA-79 in mutant mice. In wild-type PPs, PNAd does not appear during this time and MAdCAM-1 remains the dominant addressin with intense expression (Fig. 8).

We noted that the gradual appearance of PNAd in mutant mice was restricted to the developing PPs, whereas in the lamina propria at the second week both MAdCAM-1 and PNAd were absent. Because in wild-type mice expression of PNAd in pLNs is connected to signaling through LTβR (30), we next investigated the role of lymphocytes and the presence of LTβR in the appearance of PNAd on mutant HEVs by two complementary approaches. First we generated mutants where Nkx2-3 deficiency was combined with the absence of mature T and B cells by crossing Nkx2-3 mutant mice with mice lacking RAG-1 (25). Additionally, we addressed the impact of LTβR engagement by i.p. injection of LTβR-Ig fusion proteins in Nkx2-3 mutant neonates at postnatal (P) days P1, P3, and P5, followed by the analysis of addressin expression.

First we bred *Rag1*$^{-/-}$ × *Nkx2-3*$^{-/-}$ double mutant mice and compared their PP vasculature to wild-type, Nkx2-3–deficient, and RAG-1 KO mice. The limitation of this experiment is the absence of well-defined PPs in RAG-1 mutant and double KO mice, but by using anti-CD45 staining, primordial PPs comprising small clusters of leukocytes could be identified (Fig. 9A). Staining with anti-PNAd and anti–MAdCAM-1 in RAG-1–deficient mice revealed the presence of MAdCAM-1$^+$ HEVs within CD45$^+$ clusters, whereas PNAd was not observed. In *Rag1*$^{-/-}$ × *Nkx2-3*$^{-/-}$ double mutant mice only minimal MAdCAM-1 expression was seen. Intriguingly, PNAd$^+$ HEVs were noticeable in these mutants, although at a less pronounced level of PNAd display than that seen in Nkx2-3–only mutant PPs. This finding indicates that the presence of T and B cells is not required for the appearance of PNAd, but it is necessary for enhancing PNAd expression.

Next we investigated whether LTβR is indispensable for the postnatal upregulation of PNAd in PPs. LTβR-Ig fusion protein was injected in neonatal Nkx2-3–deficient mice at P1, P3, and P5, with normal human IgG as control, and the PPs were analyzed at day 14. The absence of mature follicular dendritic cells identifiable through their CR1/2 expression in the spleens of LTβR-Ig–treated mice confirmed the systemic efficiency of Ab injection (data not shown). Compared to control human Ig-injected animals, administration of LTβR-Ig led to structurally abnormal and small lym-

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

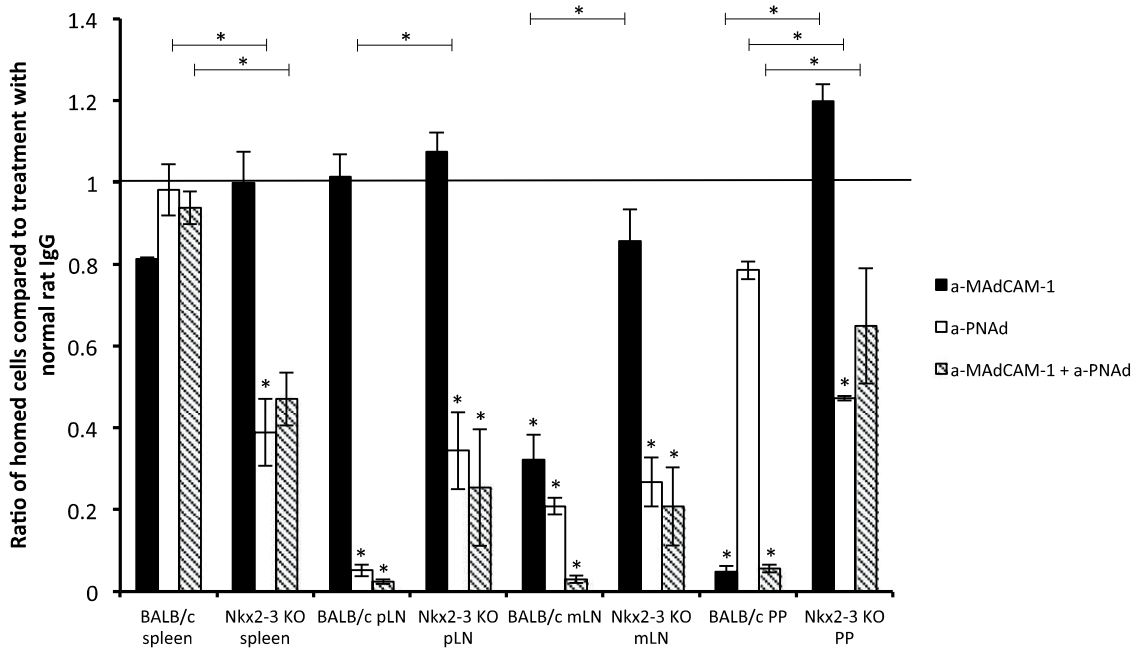


FIGURE 7. Homing to mutant GALT is dependent on PNAd expressed on HEVs. Donor lymphocytes from GFP$^+$ mice were injected i.v. into mice previously treated with control, anti-PNAd, anti–MAdCAM-1, or combined anti-PNAd/anti–MAdCAM-1 Abs, as described in text. Statistical analyses show the efficiency of homing to various lymphoid organs compared with control Ab-treated mice (indicated as a solid line at $y = 1$ corresponding to 100% efficiency) (means ± SEM, at least three mice per group). *$p < 0.05$.

phoid clusters in the intestines of treated mice. Staining with anti-CD45, MECA-79, and MECA-367 showed that with blocked LTβR signaling PNAd is absent in these lymphoid clusters. Furthermore, MAdCAM-1 was also absent, thus confirming the local efficiency of treatment (Fig. 9B). Collectively, these data indicate that the initial appearance of PNAd in Nkx2-3–deficient PP HEVs requires signaling through the LTβR, which can be provided by non–T/non–B leukocytes, but subsequent enhancement of PNAd display depends on the presence of T and/or B cells.

Discussion

Immunological protection of intestines is dependent on leukocyte recirculation between GALT and other peripheral lymphoid organs (2). In this study we addressed the effects of the Nkx2-3 deficiency on endothelial composition and HEV functionality in GALT. Previously it was shown that mice lacking Nkx2-3 develop PPs in the absence of adult endothelial MAdCAM-1 (17, 21). We found that in adult Nkx2-3 mutant mice endothelial MAdCAM-1 is replaced by PNAd in HEVs of PPs. Despite this change, however, mutant mucosal HEVs maintain the capacity for lymphocyte homing. Our observations thus suggest that Nkx2-3 is a key regulator of tissue-specific HEV patterning in intestinal lymphoid tissues, and in its absence mucosal homing can adapt to an altered HEV phenotype.

The differentiation of HEVs is an important part of the embryonic and early postnatal formation of PPs. In this process members of the TNF/LT induce the expression of stromal and endothelial MAdCAM-1, which is required for the initial recruitment of lymphocytes to the forming PP anlage (29, 30). In Nkx2-3$^{-/-}$ mice MAdCAM-1 expression is preserved in PPs until the perinatal period, in agreement with previous data demonstrating HEV-associated MAdCAM-1 in neonatal mLNs (17). The

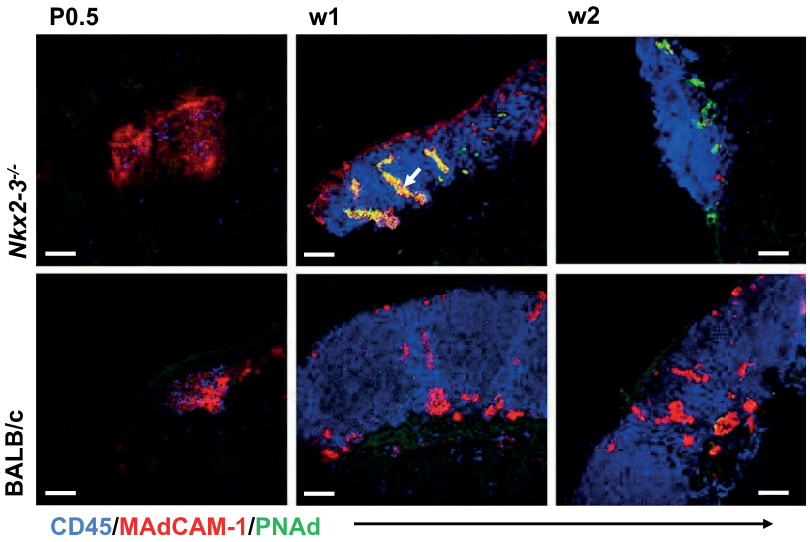


FIGURE 8. A postnatal switch in addressin molecule expression takes place in the GALT HEVs of mutant mice. PP sections from P0.5, 1-wk-old, and 2-wk-old wild-type and mutant mice were stained with anti-CD45, anti–MAdCAM-1, and anti-PNAd Abs as indicated. HEV-associated MAdCAM-1 expression is detectable at P0.5, whereas PNAd is absent. At week 1 double addressin–expressing vascular segments are present (arrow), whereas by week 2 endothelial MAdCAM-1 is largely diminished in Nkx2-3 mutant PPs. Scale bars, 100 μm. Results are representative of three different experiments with at least three mice.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

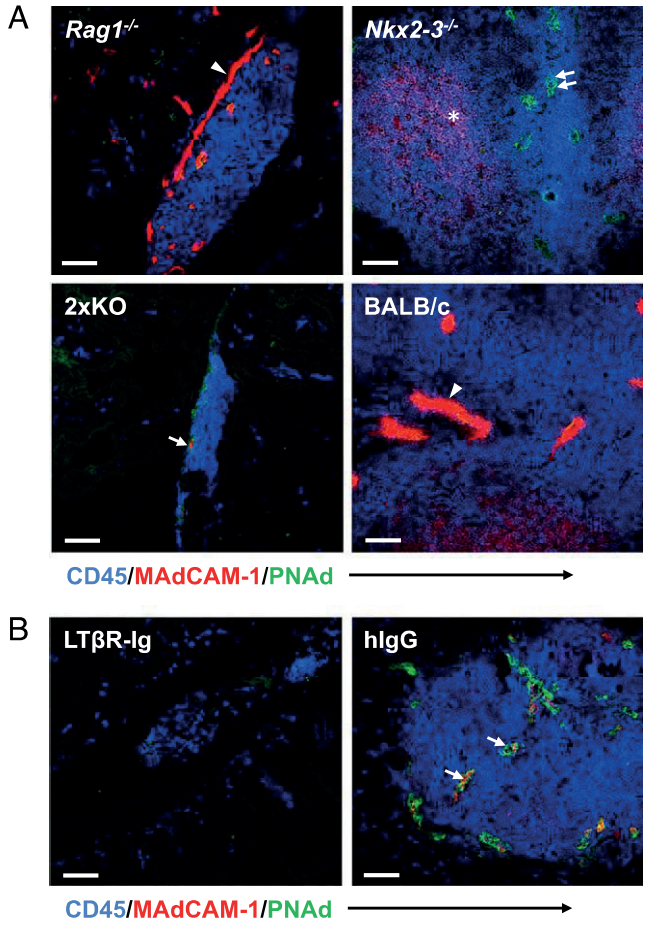


FIGURE 9. MAdCAM-1/PNAd switch occurs independently from mature T and B cells but it requires LTβR signaling. (**A**) PP sections from 4-wk-old *Rag1*$^{-/-}$, *Nkx2-3*$^{-/-}$, double-deficient, and wild-type BALB/c mice were stained as indicated. In *Rag1*$^{-/-}$ and BALB/c mice HEVs with intense MAdCAM-1 are present (arrowhead), whereas in double KO mice vessels with faint MAdCAM-1/PNAd double expression (arrow) can occasionally be observed. In *Nkx2-3*$^{-/-}$ samples MAdCAM-1 expression is restricted to PP stromal cells (*), whereas HEVs display only PNAd (double arrows). (**B**) Neonatal *Nkx2-3*$^{-/-}$ mice were treated with LTβR-Ig fusion protein (*left*) or human IgG as control (*right*) and were evaluated for addressin expression 2 wk later. HEVs in control samples coexpress MAdCAM-1 and PNAd (arrows), whereas neonatal treatment with decoy receptor extinguishes the expression of both addressins. Scale bars, 100 μm. Results are representative of three different experiments with at least three mice.

perinatal presence of MAdCAM-1 probably allows early colonization of developing PPs with lymphocytes, which may lead to subsequent enhanced expression of PNAd. The continuing expression of intestinal vessel-associated PNAd apparently requires the presence of lymphocytes, as mucosal vessels at nonlymphoid sites of gut do not switch to PNAd$^+$ endothelium, and only minimal PNAd expression is observed in *Nkx2-3*$^{-/-}$ × *Rag1*$^{-/-}$ double mutants. Appearance of mature PNAd$^+$ HEVs could efficiently be blocked by administration of soluble LTβR decoy receptor. This is in line with previous reports showing the importance of LTβR signaling in HEV differentiation and function in wild-type mice (30). Possible sources of the non–T/non–B LT signals in the *Nkx2-3*$^{-/-}$ × *Rag1*$^{-/-}$ double mutants are CD11c$^+$ dendritic cells that have been shown to influence HEV development and maintenance (32) and also retinoic acid–related orphan receptor γt$^+$ innate lymphoid cells, which have been reported to express LT (33). Germinal center–associated follicular dendritic cells continue to express MAdCAM-1 in Nkx2-3 mutant PPs, despite Nkx2-3 mRNA being expressed in stromal cells in normal mice, underlining the endothelial cell type–specific effect of the Nkx2-3 mutation. It is controversial whether the positions of PPs are stochastic or predetermined (34, 35), but the differential upregulation of PNAd expression in GALT and non-GALT vessels of the gut lamina propria in Nkx2-3 mutant mice may argue that precise positioning of PPs along the gut is developmentally predetermined and persists even when endothelial addressin expression is altered. Furthermore, circulating lymphocytes continue to reach PPs via PNAd recognition with similar efficiency as in wild-type through MAdCAM-1, and thus may supply signals necessary for the maintenance of HEV specification.

The MAdCAM-1 to PNAd switch in HEVs of mutant PPs resembles the physiological switch in pLNs of wild-type mice during the first weeks of life in which Nkx2-3 is not appreciably expressed (29). This suggests that Nkx2-3 functions as a repressor of the MAdCAM-1 to PNAd exchange. Consistent with this proposal, transcripts for Nkx2-3 are highly expressed in PPs and mLN high endothelial cells, but only minimally expressed in normal adult pLN high endothelium. Interestingly, although in wild-type mice endothelial cells of both HEVs and non-HEV capillaries within PPs express Nkx2-3 mRNA, only HEV endothelial cells display MAdCAM-1, indicating subtle differences between the impacts of Nkx2-3 expression between various elements of local vasculature (15). The occurrence of MAdCAM-1$^+$PNAd$^+$ vessels in postnatal PPs in Nkx2-3 mutants suggests that the PNAd$^+$ HEVs in adults develop from the MAdCAM-1$^+$ segments and not from MAdCAM-1$^-$ capillaries. It is not yet known how the absence of Nkx2-3 during the embryonic period can influence the postnatal deviation of vascular patterning. A similar plasticity was noted following immunization where mature HEVs in pLN reverted to an immature PNAd$^-$MAdCAM-1$^+$ phenotype, with subsequent reversal involving B cell–mediated stimulation of LTβR and B cell–dependent HEV recovery (36).

The functional consequences and the significance of the increased Treg numbers observed in Nkx2-3–deficient PPs remain to be elucidated. It is out of the scope of the present study whether this increase is the result of compensatory inducible Treg formation due to the structurally damaged small intestine of Nkx2-3 KO mice (16) or whether the loss of MAdCAM-1 and appearance of PNAd could increase homing of natural Tregs to PPs. Interestingly, L-selectin–expressing Tregs have been shown to have a higher regulatory potential than do L-selectin$^-$ cells (37). Impaired oral tolerance has been reported in *Itgβ7*$^{-/-}$ mice lacking the integrin β_7 (38). However, homing via MAdCAM-1 seems to play a less important role in inhibition of colitis, as transferred β7$^{-/-}$ Tregs were just as efficient in preventing a murine model of colitis as the wild-type cells (39).

Homing of lymphocytes to mutant PPs that have been blocked with PNAd Abs is not inhibited to the same degree as in wild-type or mutant pLNs, and also not as in wild-type PPs blocked with MAdCAM-1 Abs. Thus, the Ab-mediated blocking experiments indicate that the nearly complete loss of endothelial MAdCAM-1 in mutant GALT is possibly not compensated by HEV-associated PNAd alone. This suggests that other adhesion molecules may participate in rescuing lymphocyte homing to gut in the absence of MAdCAM-1. ICAM-1, a molecule with similar homing functions to BALT (28), seems an unlikely candidate, as our immunofluorescent data and the mRNA expression analyses fail to indicate upregulation of ICAM-1 in mutant PPs. VCAM-1 expression detectable by immunofluorescence also did not differ from wild-type controls. Alternatively, VAP-1 as surrogate addressin promoting the preferential binding of CD8$^+$ T cells in humans may also contribute to the enhanced homing of CD8$^+$ T cells in mutant

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

mice, although its tissue expression pattern in mice differs from both that of PNAd and Nkx2-3 (40, 41). Furthermore, the relatively normal homing to mutant PPs raises an important aspect related to the use of MAdCAM-1 as a therapeutic target to interfere with homing to mucosa and to induce mucosal healing (42) in chronic intestinal inflammations, often associated with elevated expression or sequence variants in the Nkx2-3 gene (22, 23). Whether these mutant vessels harbor alternative sites for L-selectin recognition other than what can be inhibited by MECA-79 remains to be seen. Thus, further studies may identify additional adhesion ligand/receptor pairs that may be regulated by Nkx2-3.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the expert assistance of Diána Heidt (Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs).

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Butcher, E. C., and L. J. Picker. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272: 60–66.
2. Rosen, S. D. 2004. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 129–156.
3. Streeter, P. R., E. L. Berg, B. T. Rouse, R. F. Bargatze, and E. C. Butcher. 1988. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 331: 41–46.
4. Nakache, M., E. L. Berg, P. R. Streeter, and E. C. Butcher. 1989. The mucosal vascular addressin is a tissue-specific endothelial cell adhesion molecule for circulating lymphocytes. *Nature* 337: 179–181.
5. Erle, D. J., M. J. Briskin, E. C. Butcher, A. Garcia-Pardo, A. I. Lazarovits, and M. Tidswell. 1994. Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin alpha 4 beta 7, on human leukocytes. *J. Immunol.* 153: 517–528.
6. Wagner, N., J. Löhler, E. J. Kunkel, K. Ley, E. Leung, G. Krissansen, K. Rajewsky, and W. Müller. 1996. Critical role for β7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 382: 366–370.
7. Steeber, D. A., M. L. Tang, X. Q. Zhang, W. Müller, N. Wagner, and T. F. Tedder. 1998. Efficient lymphocyte migration across high endothelial venules of mouse Peyer's patches requires overlapping expression of L-selectin and β_7 integrin. *J. Immunol.* 161: 6638–6647.
8. Kunkel, E. J., C. L. Ramos, D. A. Steeber, W. Müller, N. Wagner, T. F. Tedder, and K. Ley. 1998. The roles of L-selectin, β_7 integrins, and P-selectin in leukocyte rolling and adhesion in high endothelial venules of Peyer's patches. *J. Immunol.* 161: 2449–2456.
9. Wagner, N., J. Löhler, T. F. Tedder, K. Rajewsky, W. Müller, and D. A. Steeber. 1998. L-selectin and β7 integrin synergistically mediate lymphocyte migration to mesenteric lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* 28: 3832–3839.
10. Förster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Müller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99: 23–33.
11. Warnock, R. A., J. J. Campbell, M. E. Dorf, A. Matsuzawa, L. M. McEvoy, and E. C. Butcher. 2000. The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J. Exp. Med.* 191: 77–88.
12. Okada, T., V. N. Ngo, E. H. Ekland, R. Förster, M. Lipp, D. R. Littman, and J. G. Cyster. 2002. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 196: 65–75.
13. Randall, T. D., D. M. Carragher, and J. Rangel-Moreno. 2008. Development of secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 627–650 (Review).
14. Stanfel, M. N., K. A. Moses, R. J. Schwartz, and W. E. Zimmer. 2005. Regulation of organ development by the NKX-homeodomain factors: an NKX code. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)* 51(Suppl. 51): OL785–OL799.
15. Lee, M., H. Kiefel, M. D. LaJevic, M. S. Macauley, E. O'Hara, J. Pan, J. C. Paulson, and E. C. Butcher. 2014. Transcriptional programs for lymphoid tissue capillary and high endothelium reveal control mechanisms for lymphocyte homing. *Nat. Immunol.* 15: 982–985.
16. Pabst, O., R. Zweigerdt, 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.
17. 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.
18. Balogh, P., M. Balázs, T. Czömpöly, D. S. Weih, H. H. Arnold, and F. Weih. 2007. Distinct roles of lymphotoxin-β signaling and the homeodomain transcription factor Nkx2.3 in the ontogeny of endothelial compartments in spleen. *Cell Tissue Res.* 328: 473–486.
19. 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.
20. Kellermayer, Z., A. Lábadi, T. Czömpöly, H. H. Arnold, and P. Balogh. 2011. 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.* 59: 690–700.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68: 869–877.
26. Balogh, P., G. Horváth, and A. K. Szakal. 2004. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J. Histochem. Cytochem.* 52: 1287–1298.
27. Nolte, M. A., G. Kraal, and R. E. Mebius. 2004. Effects of fluorescent and nonfluorescent tracing methods on lymphocyte migration in vivo. *Cytometry A* 61: 35–44.
28. Xu, B., N. Wagner, L. N. Pham, V. Magno, Z. Shan, E. C. Butcher, and S. A. Michie. 2003. Lymphocyte homing to bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is mediated by L-selectin/PNAd, $\alpha_4\beta_1$ integrin/VCAM-1, and LFA-1 adhesion pathways. *J. Exp. Med.* 197: 1255–1267.
29. Mebius, R. E., P. R. Streeter, S. Michie, E. C. Butcher, and I. L. Weissman. 1996. 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* 93: 11019–11024.
30. Browning, J. L., N. Allaire, A. Ngam-Ek, E. Notidis, J. Hunt, S. Perrin, and R. A. Fava. 2005. Lymphotoxin-β receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. *Immunity* 23: 539–550.
31. Onder, L., R. Danuser, E. Scandella, S. Firner, Q. Chai, T. Hehlgans, J. V. Stein, and B. Ludewig. 2013. Endothelial cell-specific lymphotoxin-β receptor signaling is critical for lymph node and high endothelial venule formation. *J. Exp. Med.* 210: 465–473.
32. Moussion, C., and J. P. Girard. 2011. Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature* 479: 542–546.
33. Tumanov, A. V., E. P. Koroleva, X. Guo, Y. Wang, A. Kruglov, S. Nedospasov, and Y. X. Fu. 2011. Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge. *Cell Host Microbe* 10: 44–53.
34. Eberl, G., and M. Lochner. 2009. The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. *Mucosal Immunol.* 2: 478–485.
35. Cupedo, T., M. C. Coles, and H. Veiga-Fernandes. 2011. Structure and development of Peyer's patches in humans and mice. In *Developmental Biology of Peripheral Lymphoid Organs.* P. Balogh, ed. Springer, Heidelberg, Germany, p. 97–106.
36. Liao, S., and N. H. Ruddle. 2006. Synchrony of high endothelial venules and lymphatic vessels revealed by immunization. *J. Immunol.* 177: 3369–3379.
37. Fu, S., A. C. Yopp, X. Mao, D. Chen, N. Zhang, D. Chen, M. Mao, Y. Ding, and J. S. Bromberg. 2004. $CD4^+$ $CD25^+$ $CD62^+$ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am. J. Transplant.* 4: 65–78.
38. Hadis, U., B. Wahl, O. Schulz, M. Hardtke-Wolenski, A. Schippers, N. Wagner, W. Müller, T. Sparwasser, R. Förster, and O. Pabst. 2011. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of $FoxP3^+$ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 34: 237–246.
39. Denning, T. L., G. Kim, and M. Kronenberg. 2005. Cutting edge: $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells impaired for intestinal homing can prevent colitis. *J. Immunol.* 174: 7487–7491.
40. Salmi, M., J. Hellman, and S. Jalkanen. 1998. The role of two distinct endothelial molecules, vascular adhesion protein-1 and peripheral lymph node addressin, in the binding of lymphocyte subsets to human lymph nodes. *J. Immunol.* 160: 5629–5636.
41. Merinen, M., H. Irjala, M. Salmi, I. Jaakkola, A. Hänninen, and S. Jalkanen. 2005. Vascular adhesion protein-1 is involved in both acute and chronic inflammation in the mouse. *Am. J. Pathol.* 166: 793–800.
42. Neurath, M. F. 2014. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. *Mucosal Immunol.* 7: 6–19.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

The Journal of Immunology

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

Zoltán Kellermayer,*,† Dóra Vojkovics,*,† 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: 1833–1844.**

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, Szentágothai János Research Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary; †Lymphoid Organogenesis Research Group, Szentágothai János Research Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary; ‡Molecular Pharmacology Research Group, Szentágothai 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

ORCIDs: 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; LTi, 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

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1801117

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

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 RORγt^{+} 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$^{-/-}$ (Madcam1$^{tm1.2Nwag}$) 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 μm. 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-μm 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 μg/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/H_2O_2 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-μm 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), RORγt-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.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

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 μl 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 μg 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 synthetized 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, mRegIIIβ, mRegIIIγ, 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 ± 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$^{-/-}$ × mCD19Luc$^+$) compared with heterozygous control littermates (Nkx2.3$^{+/-}$ × 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 ± 2.2% (mean ± SEM) in BALB/c controls compared with 48.6 ± 4.2% in Nkx2.3$^{-/-}$ colons. Immature ILFs without FDCs represented 48.2 ± 4.8% in BALB/c compared with 27.8 ± 1.2% in Nkx2.3$^{-/-}$ mice. Immature ILFs containing FDCs comprised 28.0 ± 3.6% compared with 18.3 ± 3.3% in Nkx2.3$^{-/-}$ colons. Mature, PNA$^+$ ILFs constituted 9.4 ± 2.2% of SILT components in wild-type but only 5.3 ± 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$^+$/RORγt$^+$ 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.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

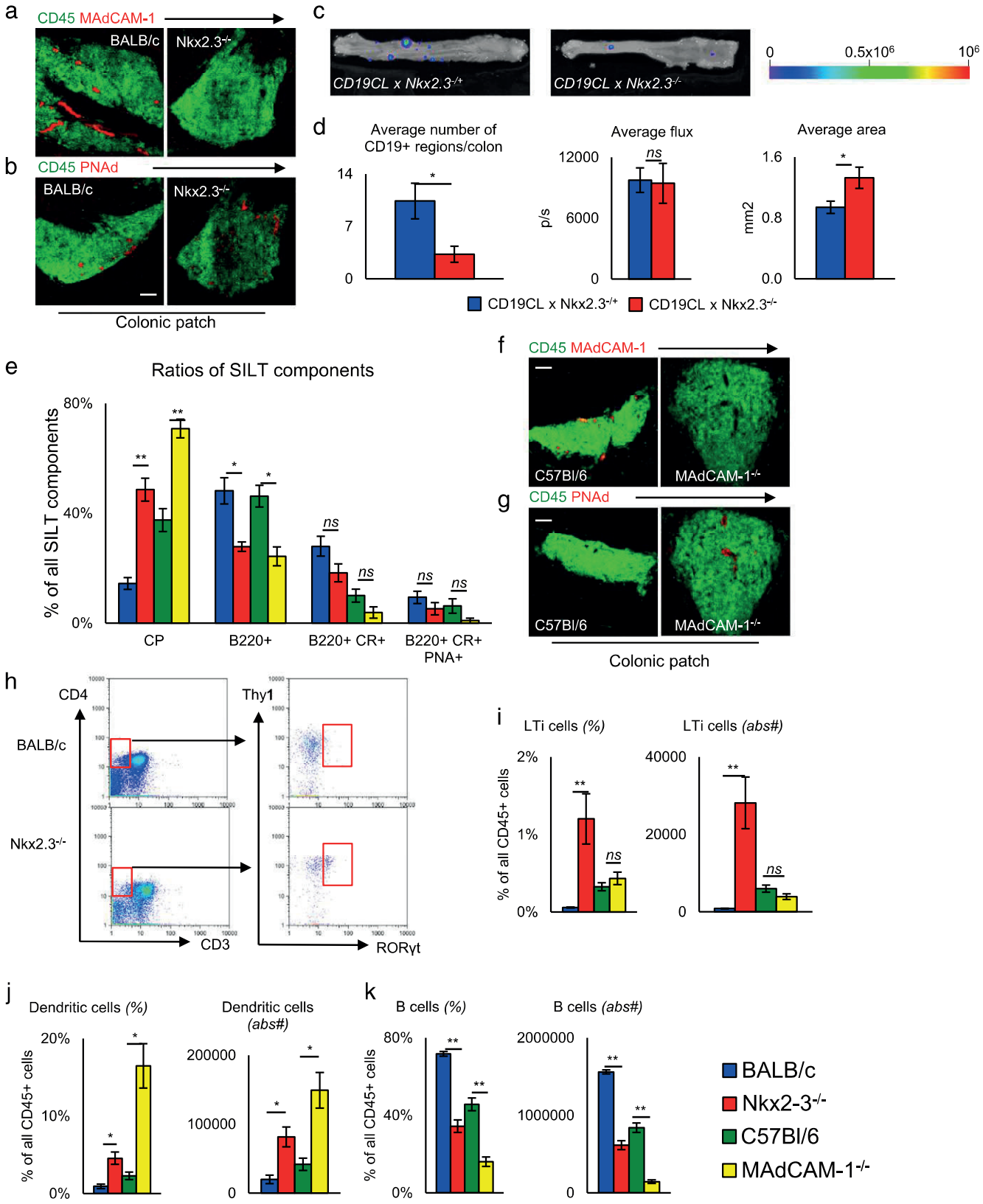


FIGURE 1. Immature SILT phenotype in the absence of Nkx2.3 transcription factor. Sections from BALB/c and Nkx2.3$^{-/-}$ colons were stained for MAdCAM-1 (red) and CD45 (green) (**a**), or PNAd (red) and CD45 (green) (**b**). Immunofluorescence images are representative images of at least five animals. 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 PNAd (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.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

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 PNAd 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 RORγt^{+} lymphoid cell and T$_{reg}$ distribution and signature cytokine production

The imbalance between RORγt^{+} cells (including CD45^{+}/CD3^{+}/CD4^{+}/RORγt^{+} Th17 cells and CD45^{+}/CD3^{-}/RORγt^{+} 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 RORγt^{+} lymphoid cells and T$_{regs}$. With flow cytometry, we observed a significantly higher frequency and absolute number of RORγt^{+} 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^{+}/RORγt^{+}/CD3^{-} cells in Nkx2.3-deficient mutants, whereas we found a reduced frequency of Nkp46^{+}/RORγt^{+}/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-β2 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 RORγt^{+} 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-β2 (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 RegIIIβ and RegIIIγ 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

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

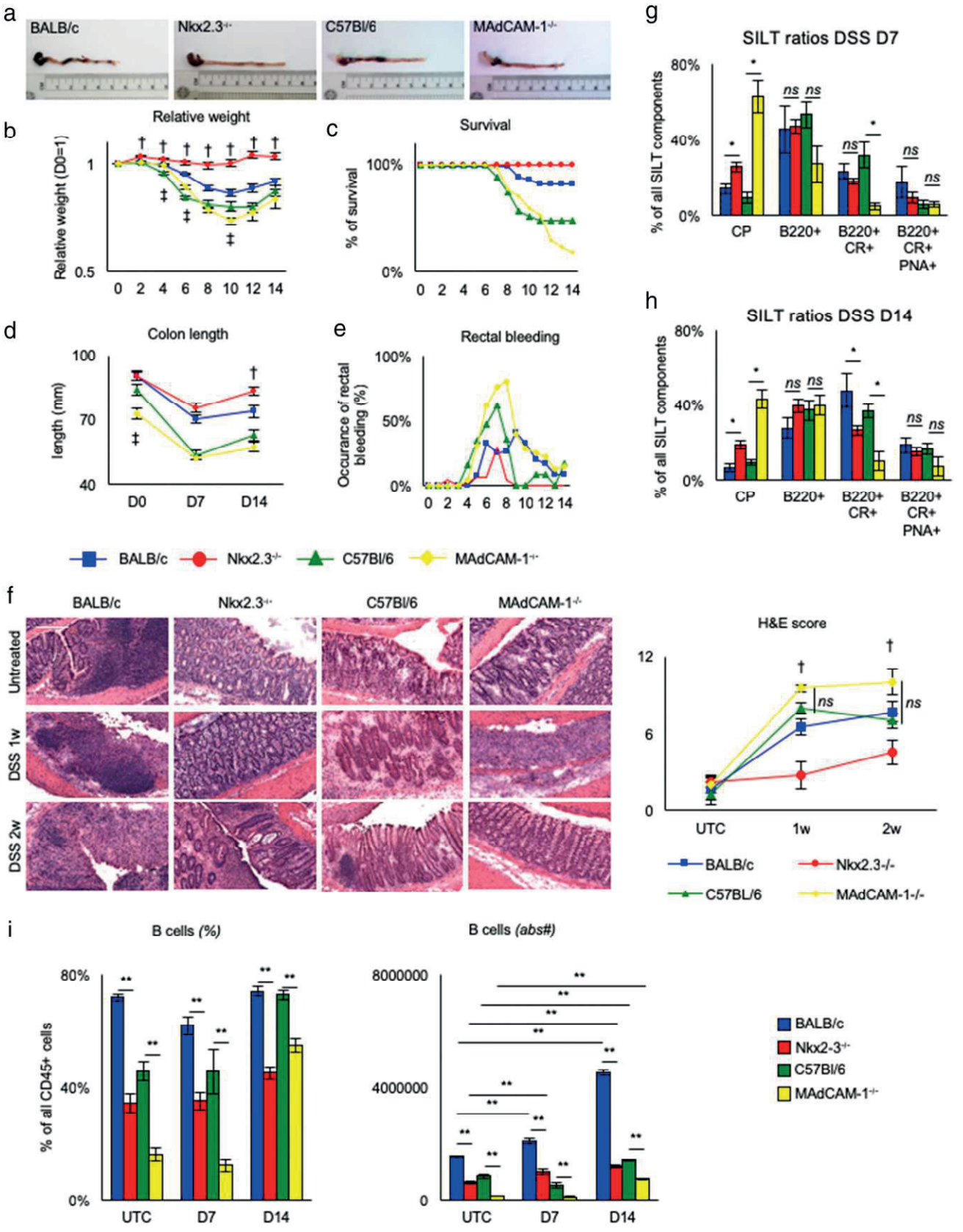


FIGURE 2. Nkx2.3$^{-/-}$ mice do not develop colitis following DSS treatment. Representative colon images (**a**), weight (**b**), survival (**c**), colon length (**d**), and macroscopic rectal bleeding (**e**) of DSS-treated BALB/c, Nkx2.3$^{-/-}$, C57BL/6, and MAdCAM-1$^{-/-}$ mice ($n > 50$ mice per 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 ×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.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

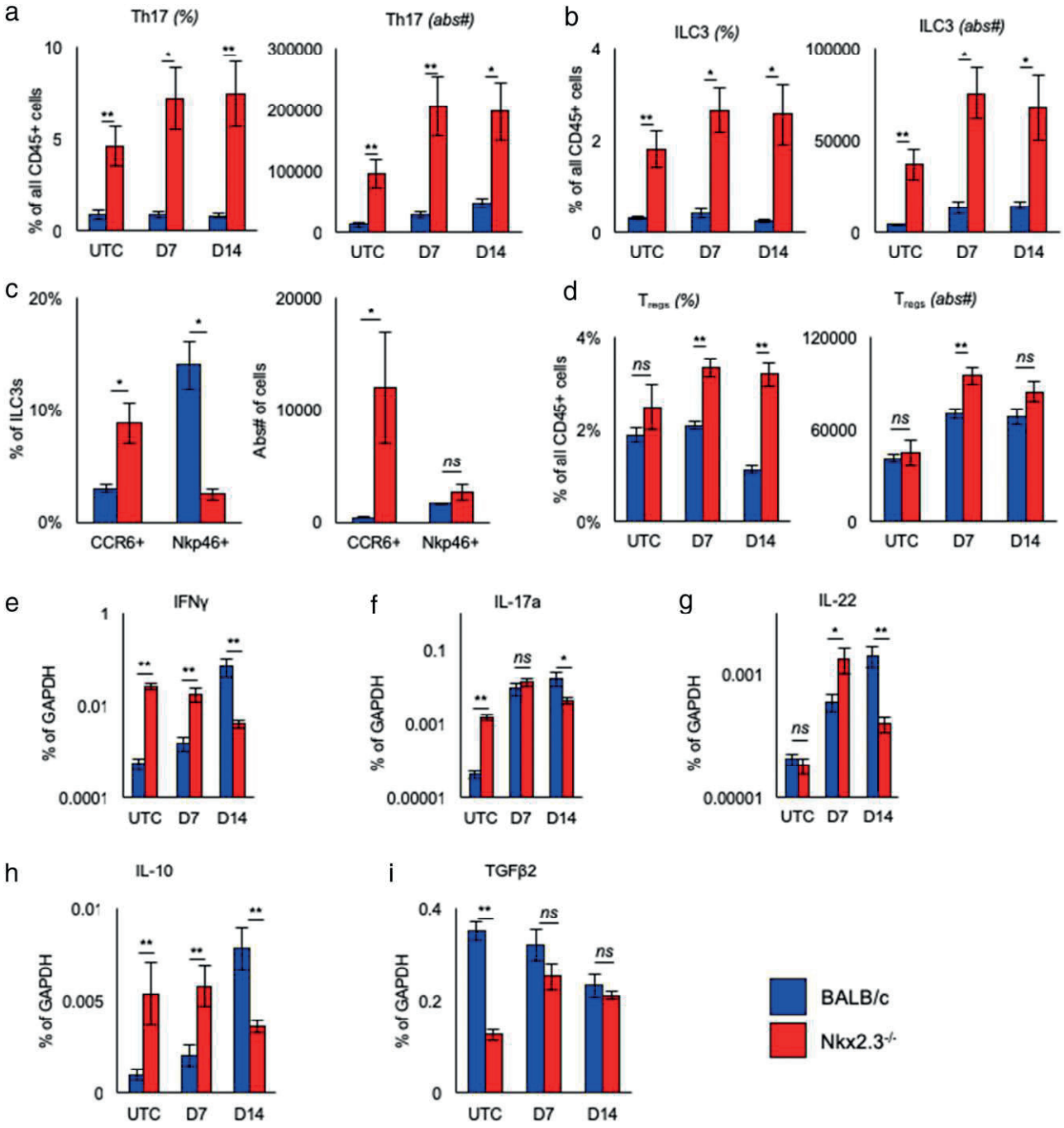


FIGURE 3. Altered colonic lamina propria lymphocyte composition and signature cytokine production in the absence of Nkx2.3. Relative (percentage of $CD45^+$ lymphoid cells) and absolute numbers (cells per colon) of Th17 cells (**a**) and ILC3s (**b**) from BALB/c and Nkx2.3$^{-/-}$ colons (n = 3–9 animals 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

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

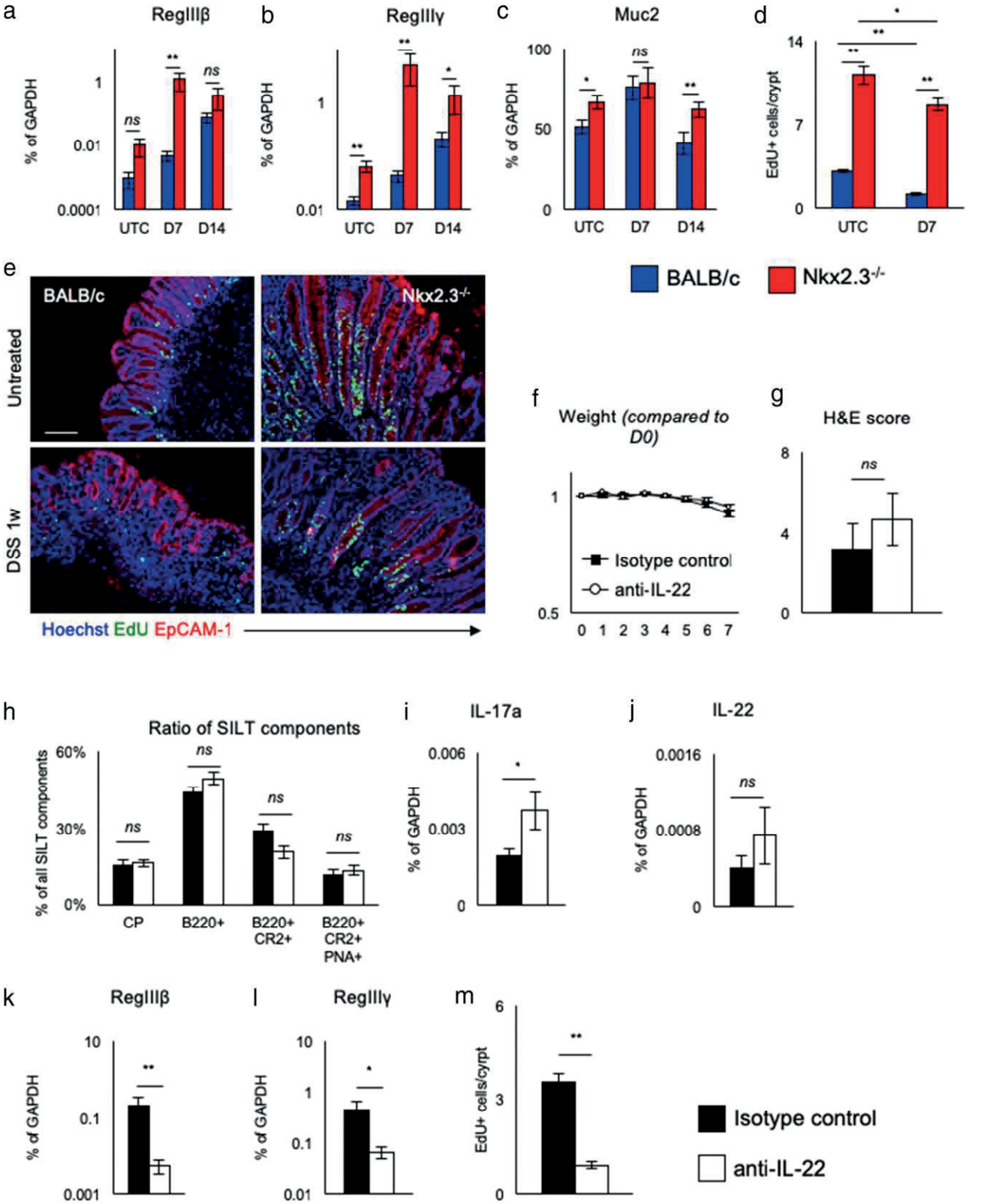


FIGURE 4. Higher levels of IL-22 do not explain protection from colitis. Real-time qPCR results from cDNA for RegIIIβ (**a**), RegIIIγ (**b**), and Muc2 (**c**) from BALB/c and Nkx2.3$^{-/-}$ distal colons (n = 5–10 animals per genotype per group). Number of EdU^{+} cells per colonic crypt in BALB/c 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 μm (**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**), RegIIIβ (**k**), RegIIIγ (**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.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

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 RegIIIβ and RegIIIγ 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

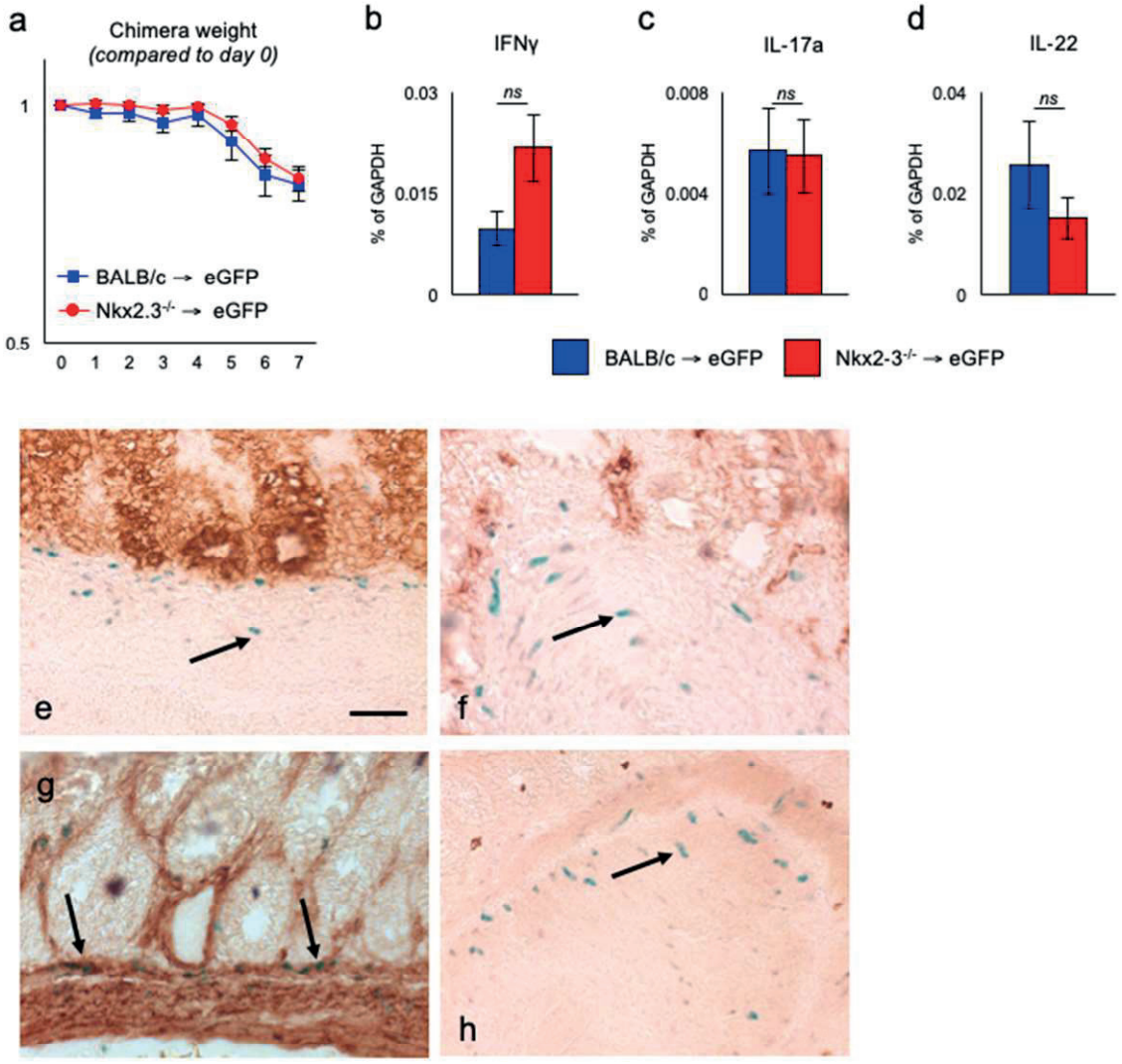


FIGURE 5. Nkx2.3 deficiency in nonhematopoietic colonic cells attenuates colitis. Weights of BALB/c → eGFP and Nkx2.3$^{-/-}$ → eGFP bone marrow chimeras that had received 2.5% DSS for 7 d (n = 5 animals per genotype) (**a**). Real-time qPCR results from cDNA for IFN-γ (**b**), IL-17a (**c**), and IL-22 (**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 ×20. ns, not significant.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

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 RORγt$^+$ ILC3s playing diverse roles in response to epithelial damage and the subsequent modulation of SILT organization (35). Intestinal ILC3 migration is mediated by α4β7 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–α4β7 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 RORγt$^+$ 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, *TITF1*), 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–α4β7 interactions in the induction of colitis. Although β7 integrin contributes to colitis, as demonstrated in a T cell–dependent CD45RB T cell transfer model (43) and in the T cell–independent

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

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

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Bouskra, 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Pabst, O., R. Zweigerdt, 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Scotto, L., M. Kruithof-de Julio, L. Paoluzzi, M. Kalac, E. Marchi, J. B. Buitrago, 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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 RORgamma t and LTi cells. *J. Exp. Med.* 208: 125–134.
23. 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.
24. 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.
25. Geremia, A., C. V. Arancibia-Cárcamo, 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.
26. Boden, E. K., and S. B. Snapper. 2008. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24: 733–741.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. Klose, C. S., and D. Artis. 2016. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* 17: 765–774.
36. 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.
37. 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

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

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. Misic, 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. Tautorat, L. Grieb, K. Tenbrock, N. Gaßler, and N. Wagner. 2016. β7-integrin exacerbates experimental DSS-induced colitis in mice by directing inflammatory monocytes into the colon. *Mucosal Immunol.* 9: 527–538.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

frontiers in Immunology

ORIGINAL RESEARCH
published: 05 March 2019
doi: 10.3389/fimmu.2019.00366

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 Vojkovics[1,2], *Zoltán Kellermayer*[1,2], *Fanni Gábris*[1,2], *Angela Schippers*[3], *Norbert Wagner*[3], *Gergely Berta*[4], *Kornélia Farkas*[5] *and Péter Balogh*[1,2]*

[1] Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs, Pécs, Hungary, [2] Lymphoid Organogenesis Research Group, Szentágothai 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
Kamalakannan 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:
Vojkovics 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 α4β7 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

dc_1678_19

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-7Rα, CD45, and α4β7 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 (RORγt) (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 α4β7 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-1expression 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-RORγt mAb (clone Q31-378) conjugated

dc_1678_19

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 8μm 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 H_2O_2 (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) in citrate-phosphate buffer, pH: 5.0. The reaction was stopped with 4 M H_2SO_4. 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 synthetized 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

dc_1678_19

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 PNAd (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

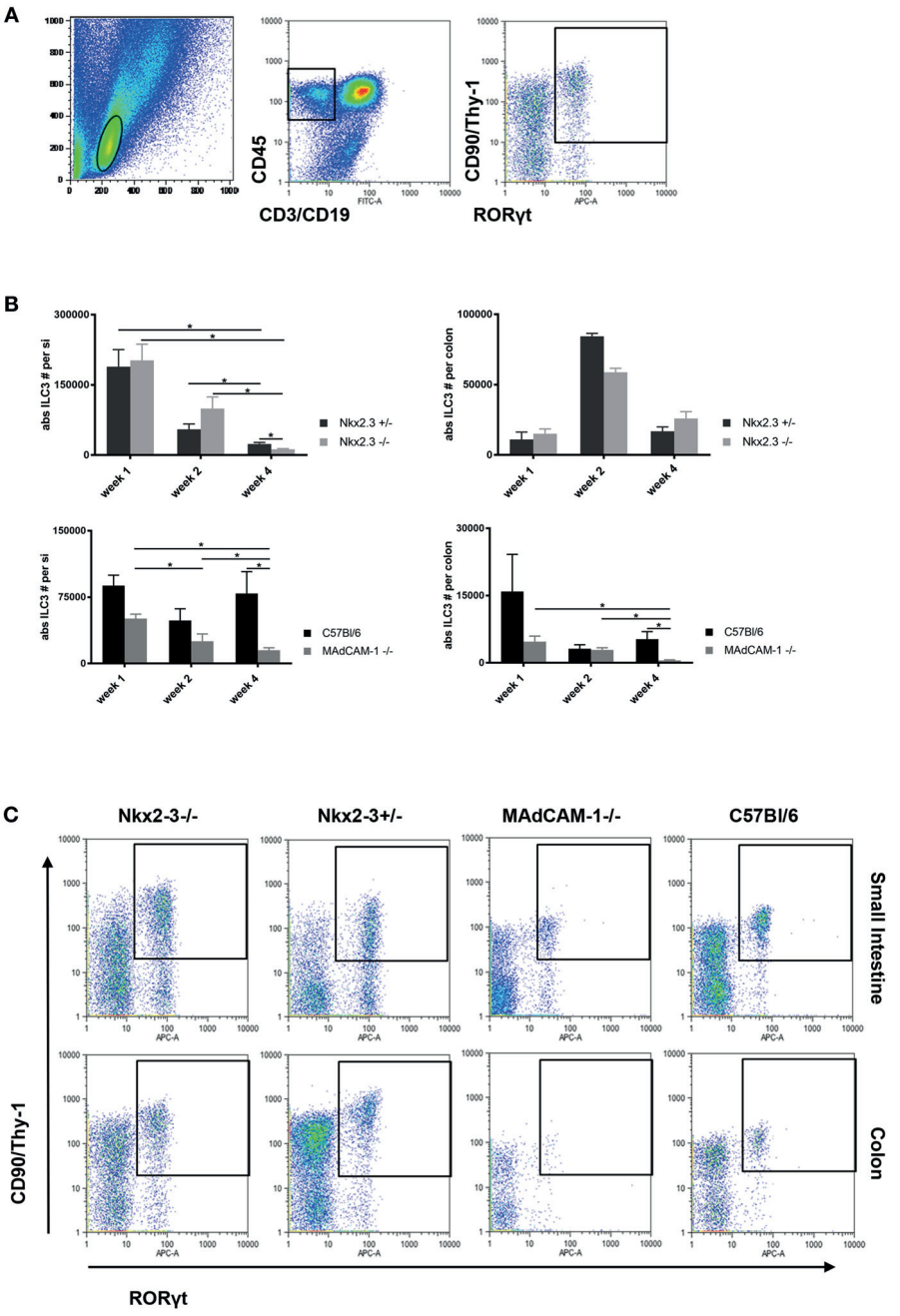


FIGURE 1 | Different distribution of ILC3 in the postnatal gut in Nkx2-3$^{-/-}$ and MAdCAM-1$^{-/-}$ mice. **(A)** Gating strategy for the identification of ILC3s defined on the basis the lymphoid gate (left: FSC/SSC ellipse) and CD45+/non-T/B lineage (middle: rectangle) combined with CD90/RORγt (right, 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

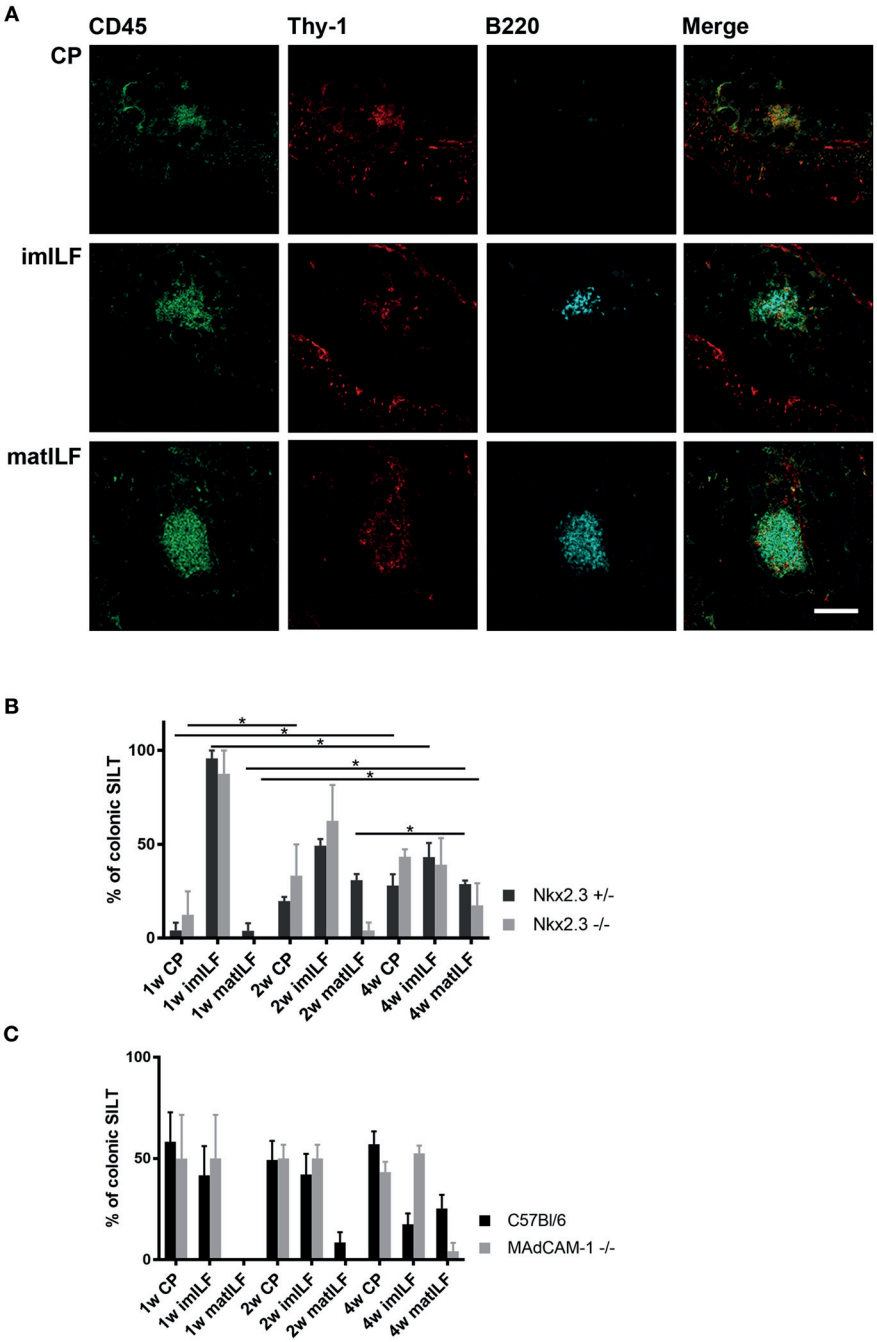


FIGURE 2 | Composition of postnatal colonic SILT spectrum. **(A)** Representative samples for cryptopatches (CP), immature (imILF), and mature (matILF) isolated lymphoid follicles of a 4 weeks old Nkx2-3$^{+/-}$ mouse using CD45/Thy-1/B220 combined immunofluorescence staining with the markers as indicated (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

dc_1678_19

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$^{-/-}$ 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 α4β7 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-α4β7/α4β1 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

dc_1678_19

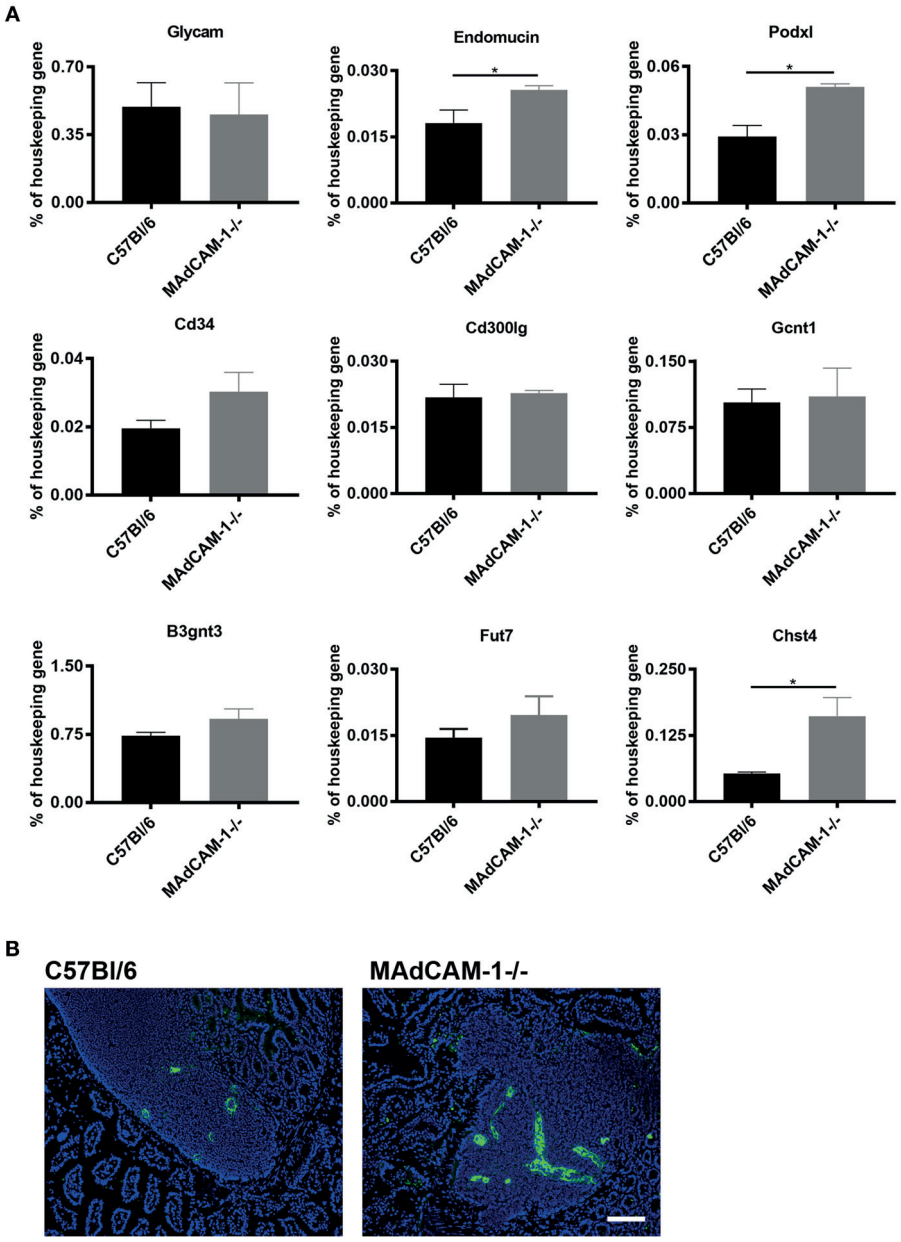


FIGURE 3 | Comparison of expression of mRNA expression for peripheral lymph node addressin core proteins and glycosylation enzymes in Peyer's patches between MAdCAM-$1^{-/-}$ and wild-type mice and the expression of MECA-79 PNAd epitope. **(A)** qPCR analyses were performed for the various core proteins (GlyCAM, endomucin, podocalyxin-like protein, CD34, and nepmucin) and glycosylation enzymes, expressed as a mRNA level relative to β-actin ($n = 6$; mean ± 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 μm).

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.

Irrespectively 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

dc_1678_19

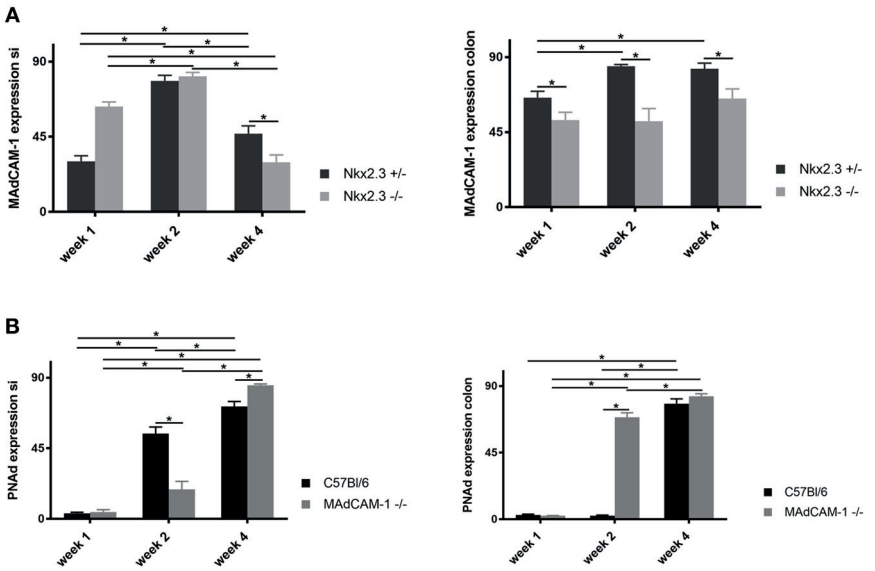


FIGURE 4 | Quantification of the expression of endothelial addressins in the postnatal period. **(A)** Relative pixel intensities (mean gray values, *y*-axis) of MAdCAM-1 labeling of small intestine (left) and colon (right) in Nkx2-3$^{+/-}$ (black filled) and Nkx2-3$^{-/-}$ (gray filled) at the periods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

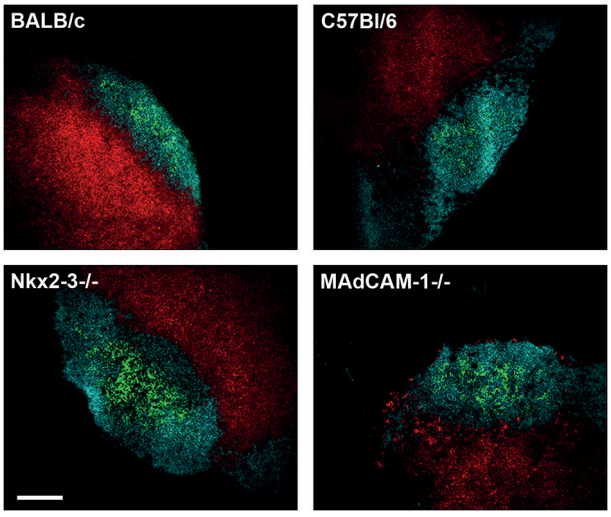


FIGURE 5 | Preserved structure of pLN in the absence of MAdCAM-1. Cryostat sections from inguinal lymph nodes of 6 weeks old Nkx2-3$^{-/-}$, Nkx2-3$^{+/-}$, MAdCAM-1$^{-/-}$, and C57BL/6 mice were stained for B cells (B220/turquoise), T cells (Thy-1/red), and follicular dendritic cells (CD21/35/green) as indicated (scale bar: 100 μm. 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/α4β7-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 α4β7 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

dc_1678_19

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 cryptopatch: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-imILF maturation may be delayed compared to CP appearance and/or imILF-matILF 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 α4β7 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

1. 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
2. Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol*. (2003) 3:292–303. doi: 10.1038/nri1054
3. Eberl G, Marmon S, Sunshine MJ, Rennert PD, Choi Y, Littman DR. An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol*. (2004) 5:64–73. doi: 10.1038/ni1022
4. 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 USA*. (1996) 93:11019–24. doi: 10.1073/pnas.93.20.11019
5. 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
6. 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
7. 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
8. Pabst O, Forster R, Lipp M, Engel H, Arnold HH. NKX2.3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen

dc_1678_19

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) 12:113. 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-Cárcamo 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.

dc_1678_19

Check for updates

dc_1678_19

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

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

Dóra Vojkovics[1,2], Zoltán Kellermayer[1,2], Béla Kajtár[3], Giovanna Roncador[4], Áron Vincze[5] and Péter Balogh[1,2]

[1]Department of Immunology and Biotechnology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary. [2]Lymphoid Organogenesis Research Group, Szentágothai János Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary. [3]Department of Pathology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary. [4]Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain. [5]1st Department of Internal Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary.

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 ÚNKP-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

Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage).

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 atrioventricular 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."[1]

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 asymmetry[21] 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 α4β7 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 mAb[29] 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 (LTβR); however, the RP vasculature is unperturbed in the absence of LTβR.[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 PNAd homing addressin in an LTβR-dependent process.[32] Similarly, the constitutive activation of the noncanonical nuclear factor κB pathway mediating LTβR signaling in *p100*$^{-/-}$/p52knock-in mice also resulted in ectopic PNAd-positive splenic HEVs; however, these endothelial cells coexpressed both MAdCAM-1 and PNAd,[33] whereas the HEVs in adult Nkx2-3–deficient mice only produced PNAd 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 LTβR 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 PNAd.[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 al[40] 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 cells[44] 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 14g32.33 (*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 nongerminal 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,

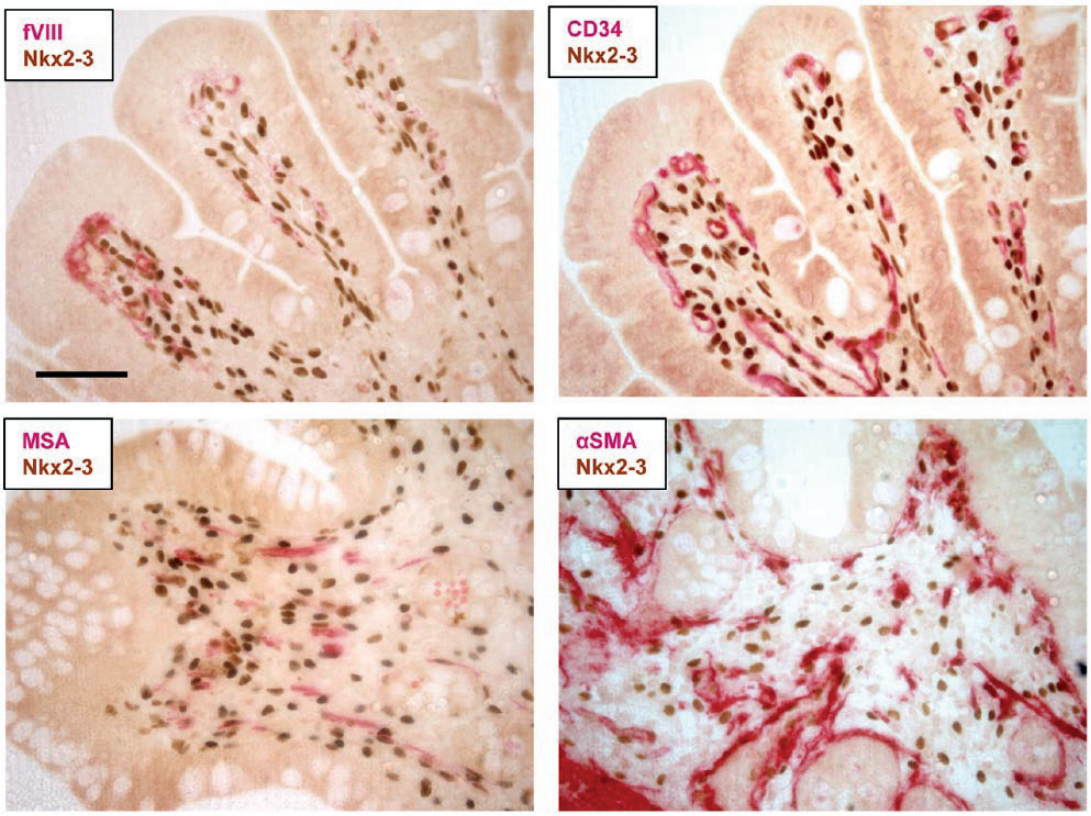


Figure 1. Immunohistochemical localization of Nkx2-3 protein expression in human colon in formaldehyde-fixed paraffin-embedded (FFPE) biopsy. Using reference labeling (in red color) for endothelial markers (factor VIII [upper left] or CD34 [upper right]) or myofibroblast-smooth muscle markers (muscle-specific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

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 *TcRα* enhancer (Eα).[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 epithelium[50] 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 *TcRδ*,[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

1. 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.
2. Hayashi S, Scott MP. What determines the specificity of action of Drosophila homeodomain proteins? *Cell*. 1990;63:883–894.
3. Jagla K, Bellard M, Frasch M. A cluster of Drosophila homeobox genes involved in mesoderm differentiation programs. *Bioessays*. 2001;23:125–133.
4. Hombria JC, Lovegrove B. Beyond homeosis—HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation*. 2003;71:461–476.
5. 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.
6. 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.
7. Weir BA, Woo MS, Getz G, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2007;450:893–898.
8. 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.
9. Stenhouse G, Fyfe N, King G, Chapman A, Kerr KM. Thyroid transcription factor 1 in pulmonary adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2004;57:383–387.
10. 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.
11. Hsu DS, Acharya CR, Balakumaran BS, et al. Characterizing the developmental pathways TTF-1, NKX2-8, and PAX9 in lung cancer. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2009;106:5312–5317.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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 Nat 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 Nat 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 lYVE-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, Mihalj 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. *Inflammat 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 Nat Acad Sci U S A*. 2016;113:E2162–E2171.
44. Stzepourginski 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 Nat 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 eTV6/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. TCRα 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.

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

Received 30 Sep 2015 | Accepted 10 May 2016 | Published 14 Jun 2016

DOI: 10.1038/ncomms11889 OPEN

Homeobox NKX2-3 promotes marginal-zone lymphomagenesis by activating B-cell receptor signalling and shaping lymphocyte dynamics

Eloy F. Robles[1,*], Maria Mena-Varas[1,*], Laura Barrio[2,†], Sara V. Merino-Cortes[2], Péter Balogh[3], Ming-Qing Du[4], Takashi Akasaka[5], Anton Parker[6], Sergio Roa[1], Carlos Panizo[7], Idoia Martin-Guerrero[8], Reiner Siebert[8], Victor Segura[9], Xabier Agirre[1], Laura Macri-Pellizeri[1], Beatriz Aldaz[1], Amaia Vilas-Zornoza[1], Shaowei Zhang[4], Sarah Moody[4], Maria Jose Calasanz[10], Thomas Tousseyn[11], Cyril Broccardo[12], Pierre Brousset[12], Elena Campos-Sanchez[13], Cesar Cobaleda[13], Isidro Sanchez-Garcia[14], Jose Luis Fernandez-Luna[15], Ricardo Garcia-Muñoz[16], Esther Pena[17], Beatriz Bellosillo[18], Antonio Salar[19], Maria Joao Baptista[20], Jesús Maria Hernandez-Rivas[21], Marcos Gonzalez[21], Maria Jose Terol[22], Joan Climent[22], Antonio Ferrandez[23], Xavier Sagaert[11], Ari M. Melnick[24], Felipe Prosper[1,7], David G. Oscier[6], Yolanda R. Carrasco[2], Martin J.S. Dyer[5] & Jose A. Martinez-Climent[1]

NKX2 homeobox family proteins have a role in cancer development. Here we show that *NKX2-3* is overexpressed in tumour cells from a subset of patients with marginal-zone lymphomas, but not with other B-cell malignancies. While *Nkx2-3*-deficient mice exhibit the absence of marginal-zone B cells, transgenic mice with expression of NKX2-3 in B cells show marginal-zone expansion that leads to the development of tumours, faithfully recapitulating the principal clinical and biological features of human marginal-zone lymphomas. NKX2-3 induces B-cell receptor signalling by phosphorylating Lyn/Syk kinases, which in turn activate multiple integrins (LFA-1, VLA-4), adhesion molecules (ICAM-1, MadCAM-1) and the chemokine receptor CXCR4. These molecules enhance migration, polarization and homing of B cells to splenic and extranodal tissues, eventually driving malignant transformation through triggering NF-κB and PI3K-AKT pathways. This study implicates oncogenic NKX2-3 in lymphomagenesis, and provides a valid experimental mouse model for studying the biology and therapy of human marginal-zone B-cell lymphomas.

[1] Division of Hemato-Oncology, Center for Applied Medical Research CIMA, University of Navarra, IDISNA, Pamplona 31008, Spain. [2] Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB)-CSIC, Madrid 28049, Spain. [3] Department of Immunology and Biotechnology, Szentágothai Research Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary. [4] Division of Molecular Histopathology, Department of Pathology, Cambridge University, Cambridge CB2 1QP, UK. [5] MRC Toxicology Unit and Ernest and Helen Scott Haematological Research Institute, Department of Cancer Studies and Molecular Medicine, University of Leicester, Leicester LE2 7LX, UK. [6] Department of Haematology, Royal Bournemouth Hospital, Bournemouth BH7 7DW, UK. [7] Department of Hematology, Clinica Universidad de Navarra, IDISNA, Pamplona 31008, Spain. [8] Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts-University Kiel & University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel 24105, Germany. [9] Bio-informatic Unit, Department of Genomics and Proteomics, Center for Applied Medical Research CIMA, University of Navarra, IDISNA, Pamplona 31008, Spain. [10] Department of Genetics, School of Medicine, University of Navarra, IDISNA, Pamplona 31008, Spain. [11] Centre for Translation Cell and Tissue Research, KU Leuven, Leuven 3000, Belgium. [12] Department of Pathology, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, Labex TOUCAN and CRCT INSERM U1037, Toulouse F-31053, France. [13] Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa, CSIC/Universidad Autonoma, Madrid 28049, Spain. [14] Experimental Therapeutics and Translational Oncology Program, Institute of Molecular and Cellular Biology of Cancer, CSIC/University of Salamanca; and Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca 37007, Spain. [15] Molecular Genetics Unit, University Hospital Marques de Valdecilla and IFIMAV, Santander 39011, Spain. [16] Hematology Department, Hospital San Pedro, Logroño, 26006, La Rioja, Spain. [17] Department of Hematology, Complejo Hospitalario de Navarra, Servicio Navarro de Salud, IDISNA, Pamplona 31008, Spain. [18] Department of Pathology, Cancer Research Program, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Hospital del Mar, Barcelona 08003, Spain. [19] Department of Clinical Hematology, Cancer Research Program, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Hospital del Mar, Barcelona 08003, Spain. [20] Department of Hematology, ICO-Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona 08916, Spain. [21] Department of Hematology, IBSAL-University Hospital and IBMCC-CSIC, University of Salamanca, Salamanca 37007, Spain. [22] Department of Hematology, Hospital Clinico, INCLIVA Biomedical Research Institute, University of Valencia, Valencia 46010, Spain. [23] Department of Pathology, Hospital Clinico, University of Valencia, Valencia 46010, Spain. [24] Department of Medicine/Hematology-Oncology, Weill Cornell Medical College, New York, New York 10065, USA. * These authors contributed equally to this work. † Present address: Dynamics of Host-Pathogen Interactions, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.A.M.-C. (email: jamcliment@unav.es).

The NKX2 family of orphan homeobox proteins is composed of transcriptional factors that regulate various fundamental cellular processes, including head patterning, cardiac and lung development, and neural cell specification[1–4]. Several NKX2 members including NKX2-1, NKX2-2 and NKX2-8 function as oncogenic drivers in solid tumours[5–8], whereas NKX2-1, NKX2-2 and NKX2-5 frequently show genomic rearrangements leading to deregulated expression in T-cell acute lymphoblastic leukaemia[8–10]. The homeobox NKX2-3 protein controls salivary gland, tooth and small intestine development[3,11,12], and has been identified as an important regulator of splenic morphology[12–14] and vasculature[15]. In fact, NKX2-3-deficient mice (Nkx2-3$^{-/-}$) showed impaired distribution of B, T and follicular dendritic cells in the spleen as a consequence of abnormal homing[12]. However, rather than modulating intrinsic lymphoid development or specification, NKX2-3 directs the splenic micro-environmental conformation to allow normal B-cell maturation, and accordingly, bone marrow reconstitution experiments failed to correct abnormal structures found in the spleens of Nkx2-3-deficient mice[11–13,15–17]. In humans, sequence variants in *NKX2-3* gene predispose to Crohn's disease and ulcerative colitis development, and NKX2-3 expression is upregulated in tissue samples from these patients[18–20]. Beyond these data, little is known about the functional roles of the homeobox protein NKX2-3, and to date it has not been implicated in cancer development[21].

Chromosomal translocations involving the immunoglobulin (*IG*) gene loci are a hallmark of B-cell lymphomas[22]. Although the molecular study of the common *IG* translocations has led to the discovery of seminal cancer genes such as *MYC*, *BCL2* and *CCND1*, cloning of other less frequent translocations has also identified genes with critical biological functions, such as *BCL9*, *BCL10* and *BCL11A*[23]. We therefore postulated that the study of rare *IG*-related translocations might still pinpoint genes with unappreciated roles in lymphocyte biology and neoplastic transformation. Molecular cloning of the breakpoints of a t(10;14)(q24;q32) chromosomal translocation in a case of B-cell lymphoma identified the *NKX2-3* gene in chromosome 10q24.2 juxtaposed to the *IG* heavy-chain (*IGH*) gene in 14q32.33, resulting in increased *NKX2-3* expression. Further quantitative PCR studies revealed increased expression of *NKX2-3* in a subset of patients with extranodal and splenic marginal-zone lymphomas (SMZLs), but not in other B-cell malignancies. Transgenic expression of human NKX2-3 in mouse B cells induced the development of lymphomas recapitulating the principal clinical and biological characteristics of human SMZL. NKX2-3 aberrant expression resulted in constitutive B-cell receptor (BCR) signalling, which in turn activated integrins, adhesion molecules and chemokine receptors that enhanced migration and promoted homing of B cells to splenic and other extranodal tissues, eventually driving malignant transformation. Our study reveals NKX2-3 as a *bona fide* oncogenic driver in marginal-zone B-cell lymphomas, and provides an experimental mouse model to study the functional biology and therapy of this lymphoma entity.

Results

***NKX2-3* expression in marginal-zone B-cell lymphomas.** Molecular cloning by long-distance inverse PCR (LDI-PCR)[24] of a chromosomal translocation t(10;14)(q24;q32) in a patient with marginal-zone B-cell lymphoma (case 1) mapped the breakpoints to 3 kb centromeric to the *NKX2-3* gene at 10q24.2 and to the 5′-Sγ3 region of *IGH* gene at 14q32.33 (Fig. 1a–c). To ascertain whether the *NKX2-3* gene locus was recurrently targeted by chromosomal translocations, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was used to screen 86 human B-cell lymphoma samples enriched for chromosome 10q22-26 aberrations based on cytogenetic data. Notably, FISH analysis of another B-cell lymphoma carrying a chromosomal translocation t(10;14)(q24;q11) (case 2) showed the juxtaposition of *NKX2-3* to the gene encoding T-cell receptor alpha (*TCRα*; Fig. 1d). In both lymphomas, increased *NKX2-3* expression was observed with respect to non-tumoral B lymphocytes (Fig. 1e). Therefore, *NKX2-3* gene expression is deregulated by chromosomal translocations involving antigen receptor loci in B-cell lymphoma.

To delineate the pattern of expression of *NKX2-3* during haematopoietic and lymphoid development as well as in lymphoid neoplasms, quantitative real-time–PCR (qRT–PCR) was performed in different FACS-sorted human cell populations and in a collection of B-cell malignancies (Fig. 1f). Although low levels of *NKX2-3* expression were detected in human bone marrow-isolated CD34$^+$ haematopoietic stem/progenitor cells, expression of *NKX2-3* could not be significantly detected in mature B cells, T lymphocytes or myeloid cells. However, together with the two cases with chromosomal translocations involving the *NKX2-3* locus, increased *NKX2-3* expression was detected in 12 of 393 samples from patients with untreated B-cell lymphoid malignancies (3%), mainly including 6 of 82 (7%) SMZLs and 4 of 67 (6%) mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas. On the other hand, *NKX2-3* expression was found in only 2 out of 244 samples (0.8%) from diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma, mantle cell lymphoma, chronic lymphocytic leukaemia or multiple myeloma ($P = 0.001$; Fisher exact test; Fig. 1f). Immunohistochemistry (IHC) analysis using a novel rat monoclonal antibody (mAb) against the full-length GST-fused human NKX2-3 form (286aa, NM_145285.1) confirmed the previous qRT–PCR data, as human non-tumoral B, T and myeloid cells appeared negative for NKX2-3 expression. However, NKX2-3 expression was selectively detected in the nuclei of splenic CD31$^+$vWF$^+$CD68$^-$CD34$^+$αSMA$^-$ cells (Fig. 1g), corresponding to endothelial cells in the red pulp sinus[25]. In addition, IHC analysis showed expression of NKX2-3 in the nuclei of lymphoma B cells with the t(10;14)(q24;q32) chromosomal translocation (case 1) as well as in other marginal-zone lymphoma cases (Fig. 1h). Finally, direct sequencing of *NKX2-3*-coding sequence showed no evidence of pathogenic mutations in lymphoma samples (Supplementary Table 1). Overall, these data indicate that NKX2-3 is normally not expressed in mature B lymphocytes, but its aberrant expression is preferentially observed in a subset of patients with marginal-zone lymphomas (including SMZL and MALT lymphomas).

Characterization of NKX2-3 deficiency in B cells. Consistent with the expression pattern of NKX2-3 in human lymphoid subpopulations, murine *Nkx2-3* was expressed at low levels in isolated bone marrow haematopoietic stem/progenitor cells and in pro-B/pre-B lymphocytes from healthy C57BL/6 mice, but not in more mature B-cell subpopulations (Fig. 2a). To explore the potential role of NKX2-3 during B-cell development, the frequency of different B-cell populations in several lymphoid organs from 4- and 8-month-old Nkx2-3$^{-/-}$ mice was examined. Flow cytometry analysis did not reveal marked differences among B- and T-cell subpopulations in the bone marrow or thymus of Nkx2-3$^{-/-}$ and wild-type (WT) animals (Supplementary Table 2). Therefore, although subtle changes in other minor subcellular fractions cannot be discarded, no evidence of NKX2-3 function at the major immature B-cell stages could be defined. However, a decrease in the total number of B cells was observed in Nkx2-3$^{-/-}$ spleens, including a complete absence of B220$^+$CD21^{high}CD23^{low} marginal-zone B cells, whereas the B220$^+$CD21^{int}CD23^{high} follicular B-cell

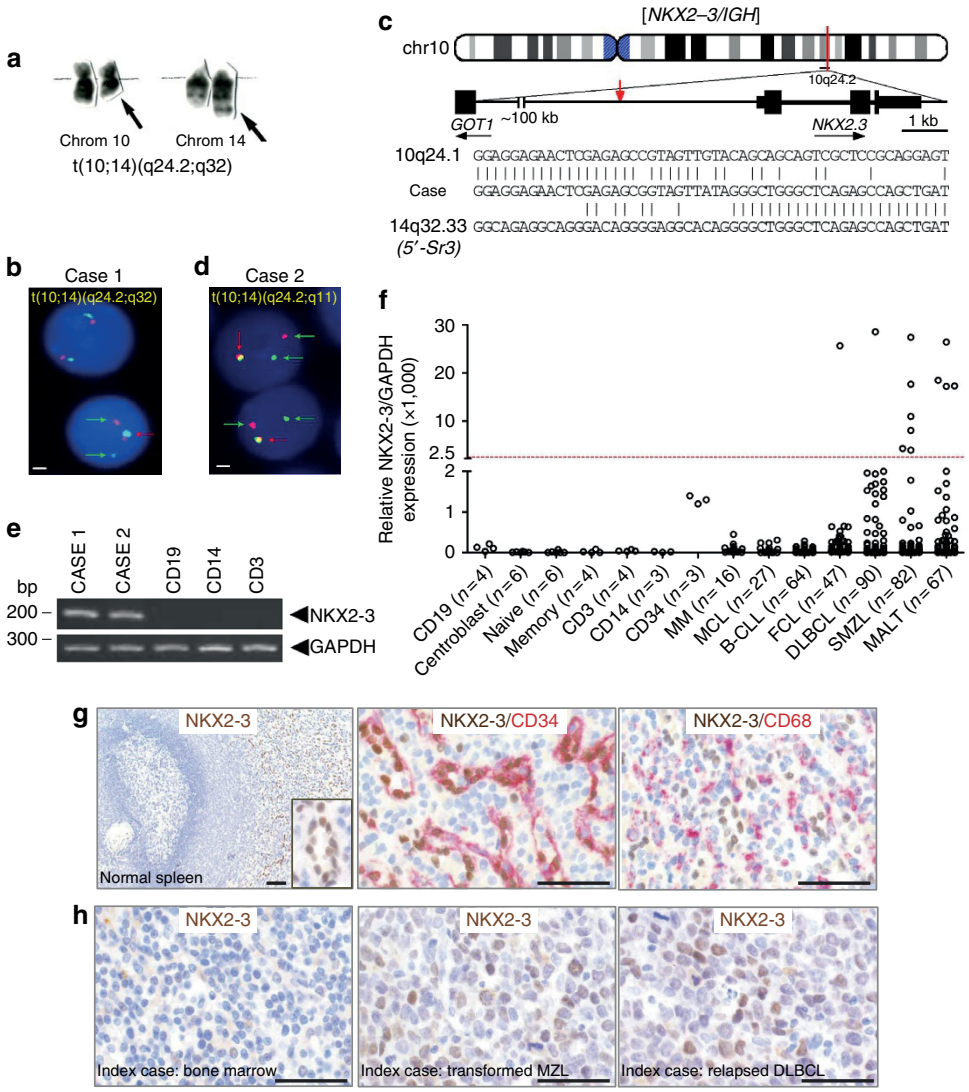


Figure 1 | *NKX2-3* expression is deregulated in marginal-zone B-cell lymphomas. (**a**) Partial G-banded karyotype showing a t(10;14)(q24;q32) translocation in a patient with SMZL (case 1). Arrows mark the derivative chromosomes 10 and 14. (**b**,**d**) Interphase FISH analysis of bone marrow cells from two patients with t(10;14) using an *NKX2-3* break-apart assay. Cells carrying the translocation show split of green and red probes (green arrows), in addition to the co-localized signals on the normal allele (red arrows). Scale represents 2 μm in all cases. (**c**) Ideogram depicts location of breakpoints cloned by LDI-PCR from the *IGHS* segment in the t(10;14)(q24;q32) from case 1. Representative breakpoint sequences with identity to *IGHS* and the corresponding *NKX2-3* gene are shown. (**e**) Expression of *NKX2-3* by reverse transcription–PCR cell subpopulations in peripheral blood of healthy donors. (**f**) *NKX2-3* expression measured by quantitative RT-PCR in samples obtained from patients with mature B-cell malignancies and in non-tumoral cells isolated from healthy donors: CD19$^+$ B cells, CD3$^+$ T cells and CD14$^+$ myeloid cells (peripheral blood); pre-germinal centre IgD$^+$ naïve B cells, post-germinal center CD27$^+$ memory B cells and CD71$^+$ germinal centre centroblasts (tonsils); and CD34$^+$ haematopoietic stem/progenitor cells (bone marrow). The cutoff value for positive NKX2-3 expression was considered when greater than s.d. (standard deviation) x4 of the mean value of the expression of CD19$^+$ cells plus CD34$^+$ cells. B-CLL, B-cell chronic lymphocytic leukaemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; FCL, follicular lymphoma; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma; MCL, mantle cell lymphoma; MM, multiple myeloma; SMZL, splenic marginal-zone lymphoma. The number of patient samples analysed in each experiment is shown. (**g**) IHC analysis of non-tumoral human spleen tissues using moAbs for NKX2-3 (clone 454C/H9), CD34 and CD68. (**h**) IHC analysis of different tissues samples from the case with t(10;14)(q24;q32) (case 1). In the left panel, the bone marrow biopsy obtained at diagnosis shows expression of NKX2-3 in scattered lymphoid B cells. In the middle and right panels, sequential lymph node biopsies obtained during histological transformation to non-GC DLBCL and subsequent relapse display nuclear expression of NKX2-3 in large B-cell lymphoma cells. Scale represents 100 μm in all cases.

compartment was comparable to WT littermates (Fig. 2b). Furthermore, this dramatic MZ phenotype was accompanied by a moderate reduction of circulating B220$^+$IgM$^+$ B cells in peripheral blood (PB) of Nkx2-3$^{-/-}$ mice (Fig. 2b). Together, these results support the notion that NKX2-3 may affect splenic marginal-zone organization through regulating homing and distribution of B cells rather than directly affecting B-cell development[11,13].

***NKX2-3* promotes expansion of splenic marginal-zone B cells.** To explore the functional consequences of NKX2-3 expression in B cells *in vivo*, C57BL/6-Tg transgenic mice using the EμSRα enhancer were generated, aiming to drive expression of human *NKX2-3* gene in B lymphocytes, thus mimicking the t(10;14)(q24;q32) in the index case 1. Two independent founder mouse lines (L1 and L2) were characterized (Supplementary Fig. 1a–d). As expected, 2-month-old mice showed restricted

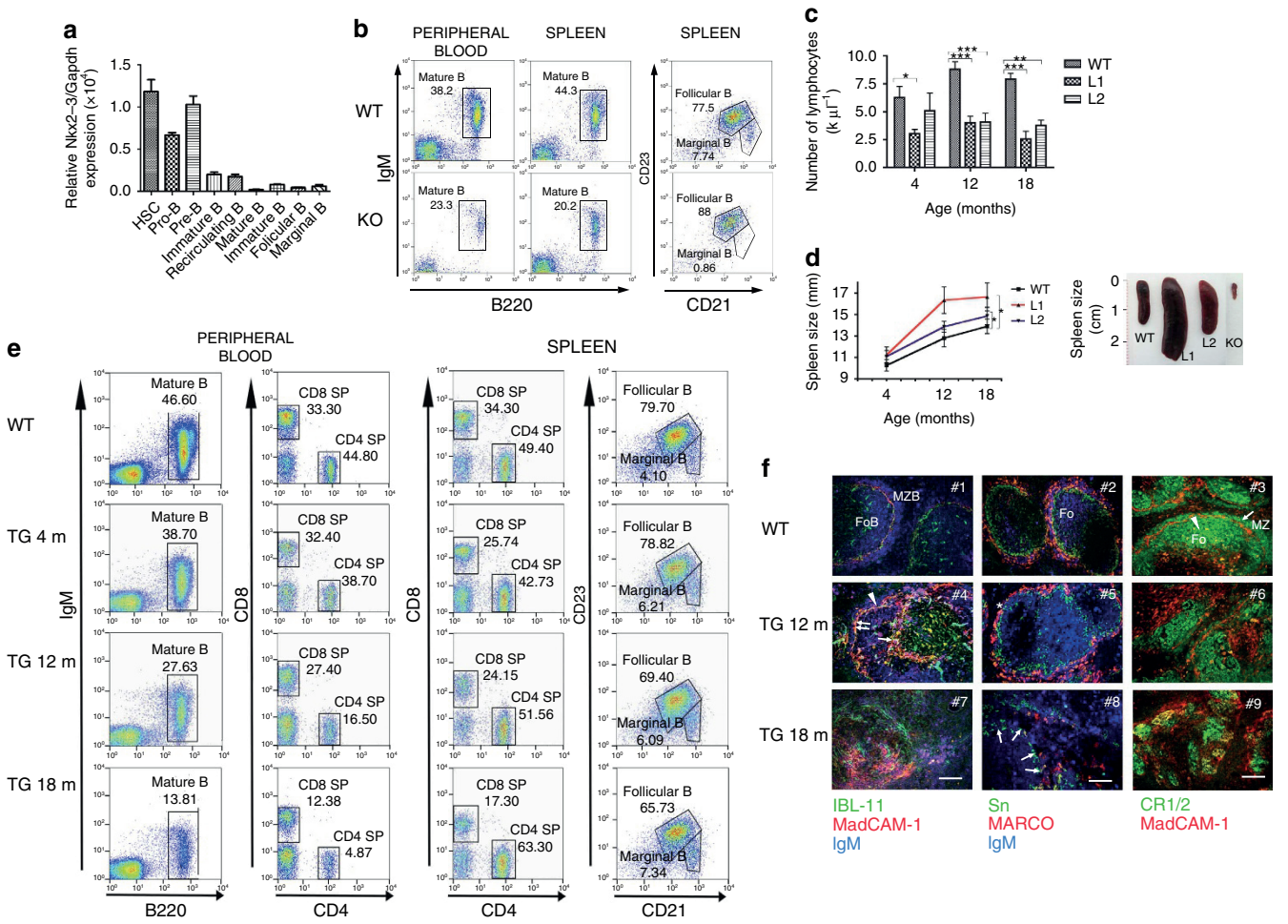
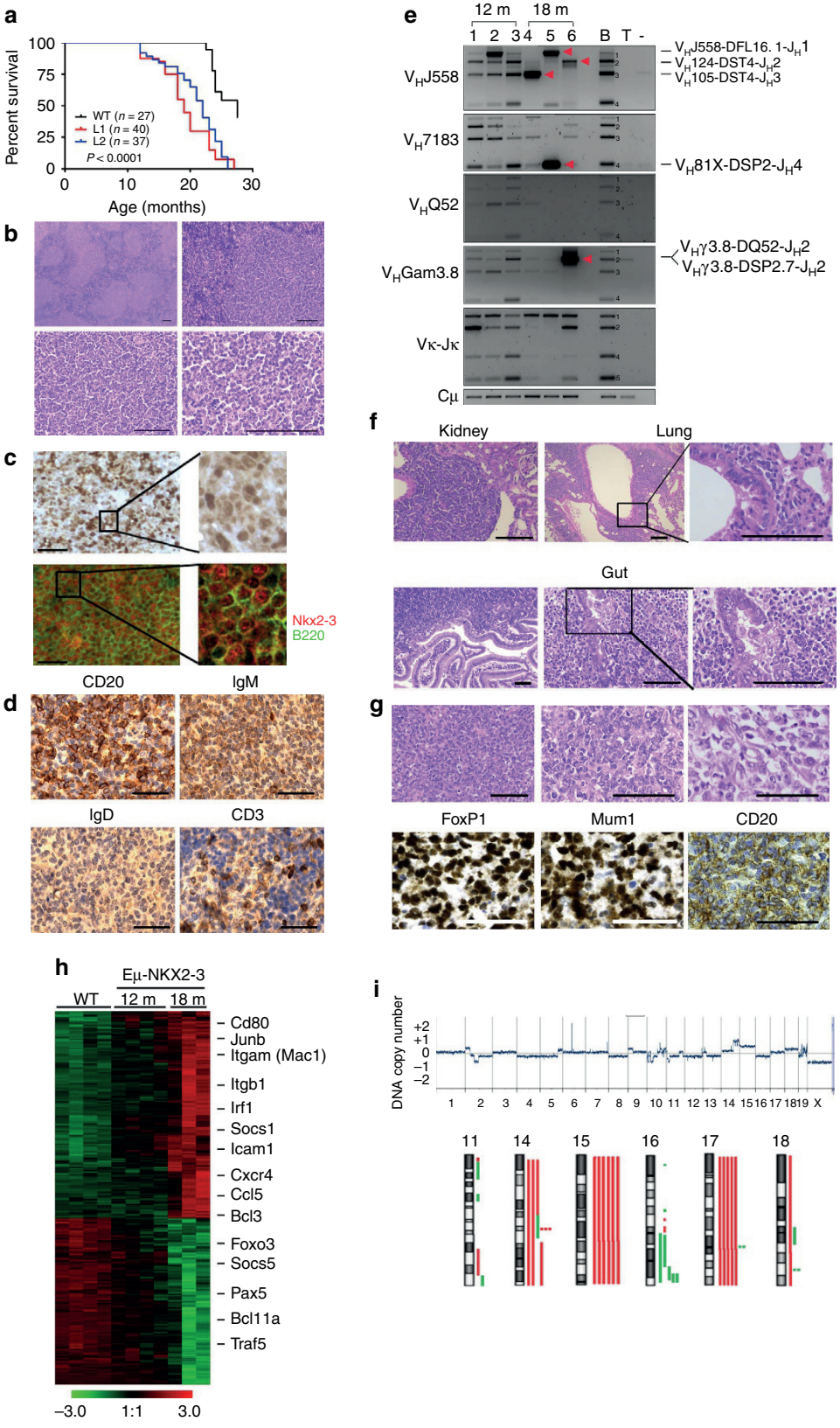


Figure 2 | Nkx2-3$^{-/-}$ and Eμ-*NKX2-3* transgenic (TG) mice show abnormal lymphopoiesis. (**a**) Murine *Nkx2-3* expression measured by quantitative RT-PCR in haematopoietic cell subpopulations isolated from healthy C57BL/6 mice. Haematopoietic stem cells (HSC, lin^{neg}Sca-1^{+}c-Kit^{+}), pro-B (c-Kit^{+}B220^{low}) and pre-B cells (CD25^{+}B220^{low}) isolated from bone marrow; mature B cells (IgM^{+}B220^{+}) isolated from peripheral blood; B220^{+}CD21^{high}CD23^{low} marginal-zone and B220^{+}CD21^{int}CD23^{high} follicular B cells isolated from the spleen. Three to six mice were used in each experiment. Error bars represent standard deviation (s.d.). (**b**) Representative flow cytometry plots showing different B-cell subpopulations in 8-month-old WT and Nkx2-3$^{-/-}$ mice (KO). (**c**) Sequential lymphocyte cell-count in peripheral blood from WT and TG mice at 4, 12 and 18 months ($n=10$ each). Error bars represent standard deviation (s.d.). Significance level of changes are indicated (two-tailed Student's *t*-test: $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.001$, $^{***}P<0.0001$). (**d**) Spleen size monitored by ultrasounds measured at 4, 12 and 18 months in WT and TG animals (WT, $n=8$; L1, $n=10$; L2, $n=12$). Spleen images from WT, TG (L1 and L2) and Nkx2-3-deficient (KO) mice. (**e**) Representative flow cytometry plots showing B- and T-cell subpopulations in PB and spleen from 18-month-old WT and 4-, 12- and 18-month-old Eμ-*NKX2-3* mice. (**f**) Immunofluorescence analyses of WT and 12- and 18-month-old TG spleens. Left column: gradual expansion of MAdCAM-1-positive IgM and plasma cells with dissolution of the follicular architecture in ageing Eμ-*NKX2-3* mice: in WT mice (top) marginal reticular cells (arrow, green) adjacent to MadCAM-1 sinus-lining cells (red) separate follicular (FoB) and MZ B cells (MZB, blue, IgM) mice. Middle column: Loss of MZ macrophages in ageing Eμ-*NKX2-3* mice: in WT mice (top) two concentric layers of MZ macrophages consist of an expanded rim of MARCO-positive (red) MZ macrophages encircling sialoadhesin-positive metallophilic macrophages (green) intermingled with IgM-positive MZ B cells (blue; Fo). Right column: dissolution of follicular stromal architecture in ageing Eμ-*NKX2-3* mice: in WT mice (top) CR1/2 receptors (green) mark FDC reticula (arrow) and outline several layers of marginal zone B cells (arrowhead) outside the MadCAM-1 rim of marginal sinus-lining cells (red; Fo, follicle; MZ, marginal zone). m, month.

expression of the *NKX2-3* transgene in haematopoietic tissues, including CD19^{+} splenic B cells and CD3^{+} T lymphocytes (Supplementary Fig. 1e,f). Although L1 mice showed higher expression of *NKX2*-3 than L2 mice, and exhibited a more pronounced phenotype, both lines showed comparable overall results. In Eμ-*NKX2-3* mice, from about 4 months of age, a progressive reduction in the number of PB lymphocytes accompanied by splenomegaly were observed (Fig. 2c,d and Supplementary Table 3). Sequential flow cytometry studies in mouse haematopoietic cell compartments at 4, 12 and 18 months of age did not find significant changes in the more immature subpopulations in the bone marrow and thymus (Supplementary Table 4). However, a gradual decline in the number of circulating PB mature B220^{+}IgM^{+} B lymphocytes and CD4^{+} and CD8^{+} T lymphocytes (including a 3.5-fold decrease in the CD4^{+}/CD8^{+} cell ratio) was observed, which became more evident in 18-month-old mice (Supplementary Table 4). Conversely, the total number of B lymphocytes increased ten times in transgenic spleens in comparison with age-matched controls, including a moderate expansion of B220^{+}CD21^{high}CD23^{low} marginal-zone B cells and a reduction of B220^{+}CD21^{int}CD23^{high} follicular B cells (Fig. 2e). Immunofluorescence (IF) analysis of the splenic tissue architecture in 12-month-old transgenic mice revealed that IgM^{+}MadCAM-1^{+} B cells were detectable, initially at the

T:B-cell boundary and the adjacent region between the follicles and marginal zone. These transgenic B cells substantially expanded by 18 months, whereas both the MadCAM-1$^+$ marginal sinus and its marginal reticular cell support were destroyed (Fig. 2f). This process was accompanied by a severe disorganization of the marginal-zone macrophage architecture, leading to the near-complete loss of MARCO-positive marginal zone macrophages and a substantial reduction in the number of sialoadhesin-positive metallophilic macrophages. In addition, gradual loss of follicular-stromal architecture (evidenced through fragmentation and collapse of follicular dendritic meshwork) was detected. However, the segregation of white pulp vasculature and



red pulp venous sinus network (lost in Nkx2-3$^{-/-}$ mice)[16] was maintained in Eμ-*NKX2-3* mice (Supplementary Fig. 2). Therefore, expression of NKX2-3 in lymphocytes led to lymphopenia in PB and to a progressive splenomegaly with marginal-zone B-cell expansion, leading to a profound disorganization of the normal splenic architecture. Notably, this picture is opposite to the atrophic spleens with the absence of marginal-zone B cells observed in Nkx2-3$^{-/-}$ mice[11,13].

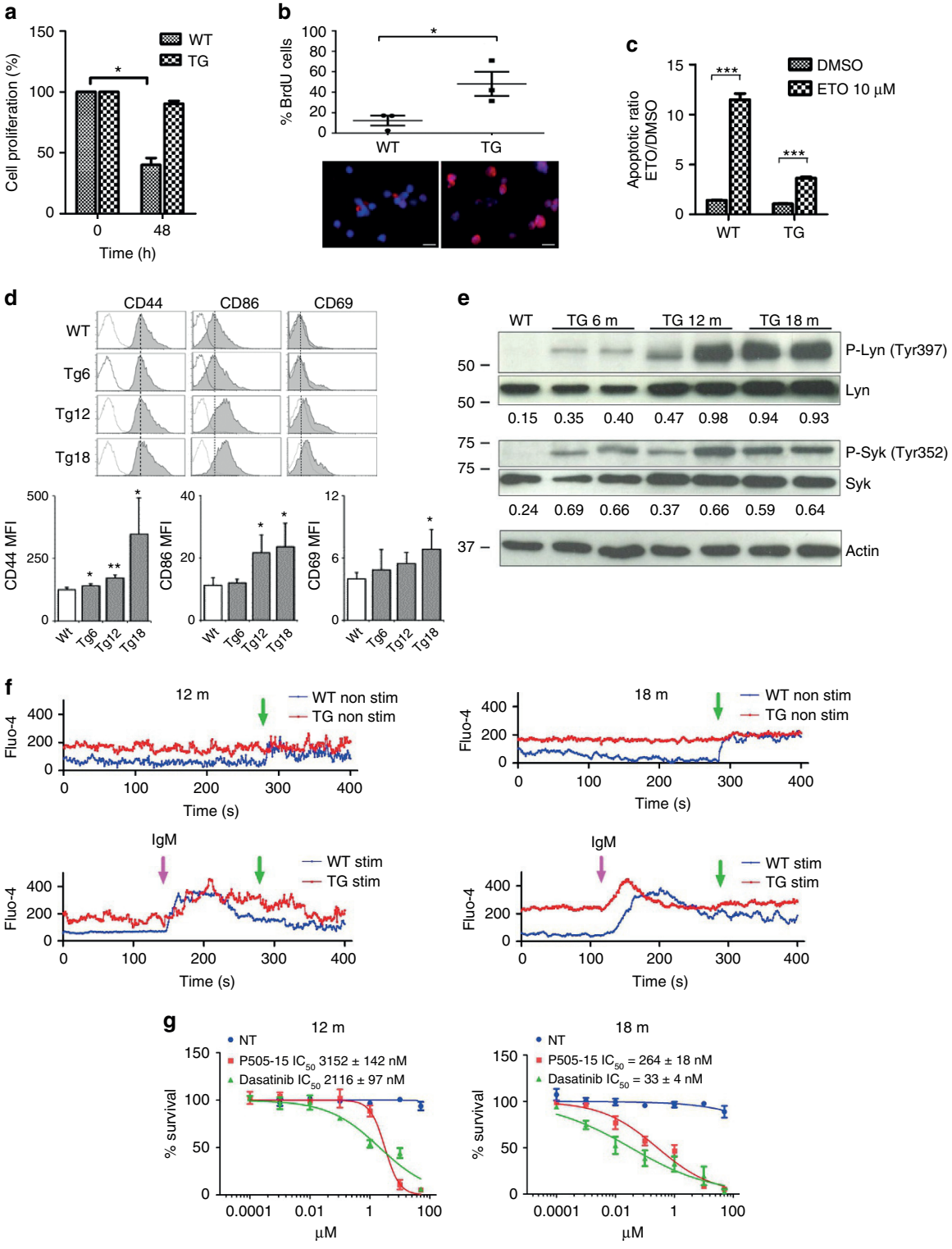
Eμ-*NKX2-3* mice develop human-like marginal-zone lymphomas. Aged Eμ-*NKX2-3* mice showed clinical signs of disease and exhibited shorter survival in comparison to WT animals (median overall survival for L1 and L2 versus WT mice, 17.5 and 20.4 months versus 25.6 months, respectively; $P<0.0001$; Fig. 3a). Upon necropsy, all 38 examined mice (26 from L1, 12 from L2) showed enlarged spleens, whereas 34 mice (89%) also displayed extranodal tumours in the small intestine ($n=30$), the kidneys ($n=22$), the liver ($n=19$), the salivary glands ($n=7$) and the lungs ($n=6$; Supplementary Table 5). Histological analysis of transgenic spleens revealed a prominent white pulp, composed of large B-cell infiltrates and poorly developed T-cell areas, with an almost absence of the red pulp. Compartmentalization of the follicle mantle into a marginal-zone and lymphocytic corona completely disappeared. The mantle-zone was almost entirely populated by small B lymphocytes and clusters of these cells could also be seen in the red pulp, sometimes invading the sinuses (Fig. 3b). IF and IHC studies detected expression of NKX2-3 in the nuclei of tumour B220$^+$ B cells, whereas NKX2-3 expression was not detected in WT mouse lymphocytes (Fig. 3c). Immunophenotypic characterization showed that B lymphocytes lacked CD5 expression, and were marked by high surface expression of IgM and low IgD expression (Fig. 3d). Analysis of *Igh*, *Igk* and *Igl* gene rearrangements revealed that 18-month-old splenic B cells harboured clonal rearrangements without *IgVh* somatic hypermutation, but this clonality was absent in younger 12-month-old transgenic mice despite significant splenomegaly being present (Fig. 3e). Collectively, these features are consistent with the diagnosis of human-like SMZL, which in a fraction of cases show unmutated *IGVH* gene sequences[26,27]. In addition, tumours within extranodal sites were composed of a heterogeneous population of small and centrocyte-like mature B cells that infiltrated the epithelium and formed lympho-epithelial lesions, mimicking human MALT lymphomas[28,29] (Fig. 3f). Notably, few splenic and extranodal lymphomas (5 of 32 cases, 16%) showed areas containing large B lymphoblasts with high proliferation rates, suggestive of histological transformation to DLBCL, which is a common feature in human marginal-zone lymphomas, including index Case 1 bearing the t(10;14)(q24;q32) translocation[30,31]. These mouse DLBCLs showed expression of Irf4 and Foxp1, but were negative for Bcl6, CD10 and Gcet1 staining, consistent with a non-germinal centre origin, which is coincident with the type of DLBCL developed in case 1 (ref. 32; Fig. 3g). Finally, splenic lymphomas could be propagated in immunodeficient Rag2$^{-/-}$IL2γc$^{-/-}$ mice (Supplementary Fig. 3a), demonstrating the malignant potential of transformed NKX2-3-positive cells. Collectively, these data show that Eμ-*NKX2-3* mice generated tumours mirroring the spectrum of human NKX2-3-expressing B-cell lymphomas.

To determine whether mouse and human lymphomas shared molecular attributes, gene expression profiling was performed in NKX2-3-expressing mouse splenic lymphomas and compared with a series of human SMZL samples. Using Linear Models of Microarray Data Analysis, 42 probe-sets were found differentially expressed between CD19$^+$ B cells isolated from WT and 12-month-old transgenic spleens, whereas this difference increased to 630 probe-sets between WT and 18-month-old splenic B cells ($B>0$; False discovery rate (FDR)<0.27 and FDR<0.02, respectively; Fig. 3h and Supplementary Data 1). These data indicate that polyclonal B cells from 12-month-old transgenic spleens display subtle gene expression differences compared with normal B lymphocytes, which substantially increase in the clonal splenic lymphomas in older mice. Then, gene expression data from resting CD19$^+$ human tonsillar B cells and human SMZL samples were used to define a human SMZL transcriptional signature ($B>0$; FDR<0.03; Supplementary Data 2), which could then be compared to the mouse lymphomas. Unsupervised clustering analysis grouped human SMZL and murine 18-month-old lymphoma samples together (Supplementary Fig. 3b). Accordingly, the human SMZL transcriptional signature appeared overrepresented in the murine 18-month-old lymphoma transcriptional datasets, but not in the 12-month-old lymphoma datasets (hypergeometric test, $P=0.0098$, and $P=0.51$, respectively). Likewise, comparison of the NKX2-3 mouse lymphoma transcriptional signature with two previously published human SMZL gene expression data sets revealed a significant overlap ($P=0.002$ and $P=0.007$; hypergeometric test)[33,34]. Finally, microarray-based high-resolution comparative genomic hybridization showed genomic abnormalities in 18-month-old clonal lymphomas (9 of 14, 64%) but not in 12-month-old splenic tumours ($n=5$). These changes targeted chromosomal areas syntenic to regions that were the most frequently rearranged in previous studies of 136 human SMZL biopsies: trisomies of 3q/12q and losses of 7q/8p (Fig. 3i and Supplementary Table 6)[35,36]. Overall, these data show that Eμ-*NKX2-3* splenic lymphomas and human SMZLs share significant histopathological, immunohistochemical, molecular and genomic features.

NKX2-3 induces constitutive BCR signalling in young mice. Virtually all human SMZL and MALT lymphomas show constitutive BCR activation, which is triggered through variable mechanisms including microbial antigenic stimulation

Figure 3 | Eμ-*NKX2-3* mice develop human-like marginal-zone lymphomas. (**a**) Kaplan–Meier overall survival curves for the two Eμ-*NKX2-3* transgenic lines and WT mice. (**b**) Haematoxilin-eosin (H&E) staining of formalin-fixed paraffin-embedded spleen tissues of Eμ-*NKX2-3* transgenic mice. Scale represents 100 μm in all cases. (**c**) Immunohistochemical (IHC) and immunofluorescence (IF) studies of transgenic spleens using NKX2-3 and B220 antibodies. (**d**) IHC studies of transgenic spleen biopsies using CD20, IgD, IgM and CD3 antibodies. (**e**) Detection of *Ig* gene rearrangements by PCR on genomic DNA from CD19$^+$ cells isolated from transgenic spleens in 12- and 18-month-old mice. *VDJH* clonal rearrangements were identified by direct sequencing (marked with red arrowheads). Approximate sizes for WT B-cell V(D)J rearrangement bands (labelled 1 to 4) are Jh1: 1800 bp, Jh2: 1200 bp, Jh3: 800 bp and Jh4: 300 bp. B and T, healthy murine B (CD19$^+$) and T (CD3$^+$) lymphocytes, respectively. (**f**) H&E staining of extranodal lymphomas developed in the kidney, the lung and the gut, showing lymphoepithelial lesions. (**g**) H&E staining of spleen tissue biopsies showing transformation areas resembling DLBCL. IHC showed positive staining for using CD20, FoxP1 and Mum1 (Irf4), whereas Gcet1, Bcl10 and Bcl6 expression was not observed. (**h**) Heat-map image of gene expression profiling data showing the 12- and 18-month-old transcriptional signatures in comparison to WT splenic B lymphocytes. (**i**) Whole-genome array-based comparative genomic hybridization (aCGH) analysis of isolated CD19$^+$ cells from nine clonal splenic lymphomas developed in 18-month-old transgenic mice. Chromosomal losses and gains are shown in green and red colours, respectively (bottom). A representative example is shown (top). m, month.

or mutations in BCR signalling components[27,28,37]. These lymphomas largely depend on BCR signalling for their survival[38]. To test whether NKX2-3-induced mouse lymphomas showed constitutive BCR signalling, B220$^+$ B cells isolated from transgenic and WT spleens were analysed. *In vitro*, transgenic B cells exhibited prolonged cell survival, increased proliferation (as shown by higher 5-bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation rates), and reduced apoptosis (shown by Annexin/PI staining) in comparison to WT B cells (Fig. 4a–c). In addition, flow cytometry analysis revealed an activated cell phenotype (CD44$^+$, CD69$^+$, CD86$^+$), which was increasingly evident in an age-dependent manner (Fig. 4d). Transgenic B cells showed surface expression of IgM and IgD, without age-related significant changes (Supplementary Fig. 4a). Investigation of the functional status of the BCR by western blot analysis revealed phosphorylation of Lyn (Tyr397) and Syk (Tyr352) tyrosine kinases in NKX2-3-expressing B cells, indicating constitutive BCR signalling (Fig. 4e). This abnormal activation was already detected in 6-month-old mouse B lymphocytes, becoming progressively more evident in 12-month-old tumours and in 18-month-old splenic lymphomas.



Accordingly, increased and more persistent basal levels of calcium mobilization were observed in transgenic B cells, either without stimulation or under anti-IgM stimulation conditions (Fig. 4f). Moreover, tumour cells exhibited reduced surface expression of CD22 and of PD-1, and diminished SHP-2 phosphatase activity in comparison to WT cells (Supplementary Fig. 4b,c). Importantly, although survival of NKX2-3 transgenic B cells from younger animals was moderately impaired after incubation with Lyn and Syk inhibitors, this impairment was significantly greater in 18-month-old clonal B-cell lymphoma cells (IC_{50} within low nano-molar ranges; Fig. 4g). These data indicate that NKX2-3-expressing B cells are prone to exhibit an activated phenotype and prematurely trigger BCR signalling in young mice even before developing clinical evidence of disease. Furthermore, constitutive BCR activation appears increasingly evident with time, and transgenic B cells become progressively dependent on BCR signalling for survival.

It is known that constitutive BCR signalling in human SMZL cells commonly activates downstream NF-κB pathways, and less frequently alternative MAPK, NFAT and AKT/mTOR pathways[27,28,39,40]. To determine whether similar events occurred in the NKX2-3-induced splenic lymphomas, investigation of the status of the BCR downstream signalling cascades was performed. Western blot analysis revealed phosphorylation of AKT, leading to PI3K-mTOR activation, but not of other MAP kinases including JNK and p38 (Fig. 5a). In addition, activation of the canonical NF-κB cascade (as shown by higher expression levels of nuclear p50—pointing to an increased processing of p105- and of c-Rel proteins) but not of the alternative NF-κB pathway was detected (Fig. 5b,c). Canonical NF-κB signalling increased the expression of gene components of the NF-κB pathway and NF-κB target genes ($P<0.000001$) in the 18-month-old transcriptional lymphoma data set, and also induced overexpression of NF-κB target proteins (Fig. 5d,e). Super-shift assays carried out using antibodies against NF-κB subunits showed a shift of p50 band in transgenic B cells, thus confirming the previous findings (Supplementary Fig. 5a). Of note, although Lyn and Syk phosphorylation were detected in 6-month-old transgenic B cells, activation of PI3K-AKT or NF-κB signalling were detected in 18-month-old clonal lymphoma cells but not in younger mice, demonstrating them to be late events during lymphoma development (Supplementary Fig. 5b,c). Overall, these data suggest that chronic activation of BCR signalling is an early event in the transformation of NKX2-3-expressing mature B cells, whereas constitutive activation of downstream PI3K-AKT and NF-κB pathways appears to be late events potentially contributing to lymphomagenesis.

NKX2-3 regulates B cells dynamics in lymphoid tissues. In normal and malignant B cells, BCR signalling regulates lymphocyte dynamics by modulating their traffic and tissue location[41]. Moreover, previous studies of Nkx2-3$^{-/-}$ mice here and elsewhere already pointed towards a critical role of NKX2-3 in the organization of the marginal-zone area and the lymphocyte homing in the spleen, involving the deregulation of chemokines and cell adhesion proteins such as MadCAM-1 (refs 11–15). To test whether this was the case in the Eμ-*NKX2-3* mouse model, flow cytometry analysis for relevant homing makers was applied to isolated transgenic and WT CD19$^+$ B cells. Remarkably, increased expression of multiple cell surface proteins implicated in homing and cell motility was detected in the tumour cells, including integrins such as LFA-1 (CD11a), VLA-4 (CD49d) and MAC-1 (CD11b), and adhesion molecules such as MadCAM-1, ICAM-1 (CD54) and L-selectin (CD62L). In addition, augmented expression of the chemokine receptor CXCR4, but not of CXCR5 or CCR7, was detected in transgenic B cells (Fig. 6a and Supplementary Fig. 6a). Like BCR signalling, these phenotypic changes occurred gradually, being detected from 12 months of age and thereafter. However, these were not observed in younger mice. Functional studies of cell adhesive and motile capacities revealed that transgenic B cells displayed a significant and progressive increase in migration, either without stimuli or in the presence of CXCL12 (CXCR4 ligand), CCL21 (CCR7 ligand) and CXCL13 (CXCR5 ligand) gradients (Fig. 6b). Next, assessment of integrin activation and cell adhesion showed that, in the absence of stimuli, lymphoma cells increased their adhesion to both ICAM-1- and VCAM-1-containing substrates (Fig. 6c, Supplementary Fig. 6b), indicating basal activation of LFA-1 and VLA-4 integrins, respectively. Then, using a two-dimensional model based on artificial planar lipid bilayers containing GPI-linked ICAM-1 (ref. 42), B-cell dynamics was analysed in real time. Although no differences were observed in young mice (Supplementary Movie 1), a significant enhancement in cell polarization (membrane protrusion activity) and motility was observed in 12-month-old and older transgenic B cells, which moved with higher mean velocity values and described longer tracks than WT B lymphocytes (Fig. 6d,e and Supplementary Movies 2 and 3). NKX2-3-expressing B cells also moved faster in response to CXCL12 or CXCL13 chemokines (Fig. 6e, Supplementary Fig. 6c and Supplementary Movies 4–6). Finally, transgenic cells adhered more strongly between them in comparison to WT B lymphocytes, forming large clusters *in vitro* (Fig. 6f and Supplementary Movies 3–6). To better visualize cell cluster formation *in vivo*, IF analysis of transgenic spleen sections was performed. A progressive development

Figure 4 | NKX2-3 induces B-cell receptor signalling in B cells from young mice. (**a**) Cell survival of *in vitro* cell cultures containing isolated CD19$^+$ cells from WT and transgenic (TG) mice. Data from three experiments are shown. (**b**) BrdU staining of WT and TG splenic CD19$^+$ cells isolated after 20 h of BrdU administration. A representative merged DAPI (blue) and BrdU (red) staining image is shown (bottom). Results of BrdU quantification in WT and TG mice are shown (top). Scale represents 10 μm in all cases. (**c**) Apoptosis quantification after 48 h of incubation with etoposide (ETO) or dimethylsulphoxide (DMSO) in B cells from WT and NKX2-3 TG mice. Data from three experiments are shown. Error bars represent standard deviation (s.d.). The statistical significance levels of the changes are indicated (two-tailed Student's *t*-test: *** $P<0.0001$). (**d**) Top, Representative flow cytometry profiles (grey filled histogram) of the indicated molecules at the surface of WT B cells and NKX2-3 TG B cells of the specified ages (Tg6, 6-month-old mice, Tg12, 12-month-old mice and Tg18, 18-month-old mice). Dashed black line, maximum expression levels in WT B cells. Dotted histogram, isotype control. Bottom, quantification of the mean fluorescence intensity (MFI) for CD44, CD86 and CD69 surface expression in WT and Tg B cells of the indicated ages; data are the mean ± s.d. ($n=3$ mice in each case). (**e**) Western blot analysis showed increased phosphorylation levels of Syk and Lyn kinases in CD19$^+$ splenic B cells isolated from TG mice at 6, 12 and 18 months. Quantification of phosphorylated Lyn and Syk proteins was determined by densitometry, indicating the ratio respect to the non-phosphorylated form. (**f**) Kinetics of calcium mobilization in splenic B cells from WT and TG NKX2-3 mice at 12 and 18 months. Top and bottom graphs show the kinetics of non-stimulated and stimulated cells with goat anti-mouse IgM, respectively. Pink arrows indicate the time points of the stimulation (stim.), whereas green arrows indicate the time points of addition of Ca^{2+}-containing buffer. (**g**) Survival of splenic Eμ-*NKX2-3* CD19$^+$ B-cell lymphoma cell cultures incubated with the Syk and Lyn protein inhibitors (P505-15 and Dasatinib, respectively) at increasing concentrations. Non-treated cells (NT) were incubated with DMSO. IC_{50}, half maximal inhibitory concentration. Error bars indicates s.d.

of small-to-medium sized clusters composed of LFA-1- and ICAM-1-expressing cells intermingled with IgM-producing cells was documented in 12-month-old tumours, reflecting that the cluster formation was facilitated by adhesion molecules and integrins that favoured adhesion of B cell among themselves and with surrounding environmental cells, promoting the development of large non-clonal tumour masses. Eventually, in 18-month-old spleens, clonal tumours increased in size and completely disorganized the splenic architecture (Fig. 6g).

To ascertain whether B cells from patients with SMZL with expression of NKX2-3 showed similar homing features to those observed in Eμ-*NKX2-3* murine splenic lymphomas, eight PB samples from patients with untreated SMZL and from six healthy donors were analysed. Using qRT–PCR, one of the eight SMZL samples showed expression of *NKX2-3*. Interestingly, these P3 lymphoma cells exhibited higher expression levels of LFA-1 and CXCR4 in comparison to *NKX2*-3-negative SMZL samples (Fig. 6h). Furthermore, and consistently with our previous results in mice (Fig. 6b), B cells from P3 lymphoma also showed an increased migration index to CXCL12 with respect to the other samples (Fig. 6i). These results indicate that human SMZL with expression of NKX2-3 partially recapitulates the features of NKX2-3-induced lymphomas in mice.

NKX2-3-expressing B cells are sensitive to BCR blockade. Next, to determine the molecules responsible for the observed changes in lymphocyte dynamics, transgenic B-cell lymphoma cells were incubated with different chemical inhibitors. Although no major differences were observed in cell migration in the absence of stimuli, in the presence of CXCL12 gradients, migration of B cells was almost completely abrogated with a selective CXCR4 antagonist (AMD3100), but not with compounds blocking LFA-1 function (A286982; anti-LFA1 antibody; Fig. 7a). Conversely, adhesion of transgenic B cells to ICAM-1-containing substrates was markedly reduced by blocking LFA-1 or ICAM-1–LFA-1 interactions, but not upon CXCR4 inhibition (Fig. 7b). Similarly, cell motility was selectively impaired with ICAM-1/LFA-1 inhibitors but not with the CXCR4 antagonist, while cell polarization was not affected (Fig. 7c). Then, whether BCR signalling contributed to the changes in lymphocyte dynamics was investigated by incubating transgenic B cells with non-lethal doses of Lyn and Syk chemical inhibitors. A partial reduction in Lyn/Syk phosphorylation levels was associated with the reversion of the observed phenotype, including the abrogation of cell migration in the presence of CXCL12 gradients, adhesion to ICAM-1 membranes and abnormalities in cell motility (Fig. 7d–f). Overall, these data show that NKX2-3-induced BCR signalling increased the expression of multiple surface molecules in transgenic B cells, including CXCR4 that increased cell migration, whereas ICAM-1 and LFA-1 enhanced cell adhesion and motility. These cells abnormally homed to secondary lymphoid tissues, leading to progressive B-cell accumulation and eventually driving malignant transformation.

Finally, we used the NKX2-3-induced mouse lymphomas to evaluate the potential therapeutic efficacy of drugs targeting the BCR and downstream signalling molecules. Treatment with the PI3K inhibitor Idelalisib (IC_{50}, 1.5 μM), the BTK inhibitor Ibrutinib (IC_{50}, 6 μM), the MALT1 proteolytic inhibitor MI2 (IC_{50}, 0,56 μM), the NF-kB inhibitor Bay11-7082 (IC_{50}, 13.4 μM) and two drugs currently used in the treatment of SMZL (bendamustine and fludarabine) reduced B-cell lymphoma cell survival, but to a much lesser extent than the chemical inhibitors of Lyn (Dasatinib, IC_{50}, 33 nM) and Syk (p505-15, IC_{50}, 264 nM) kinases (Fig. 7g). These data suggest that targeting the BCR with Lyn and Syk inhibitors may be of therapeutic value in patients with marginal-zone lymphoma.

Discussion

This study reveals that *NKX2-3* is targeted by *IG*-related translocations and is abnormally expressed in a subset of patients with extranodal and SMZLs, but very rarely in other B-cell malignancies. Although several members of the NKX2 homeobox

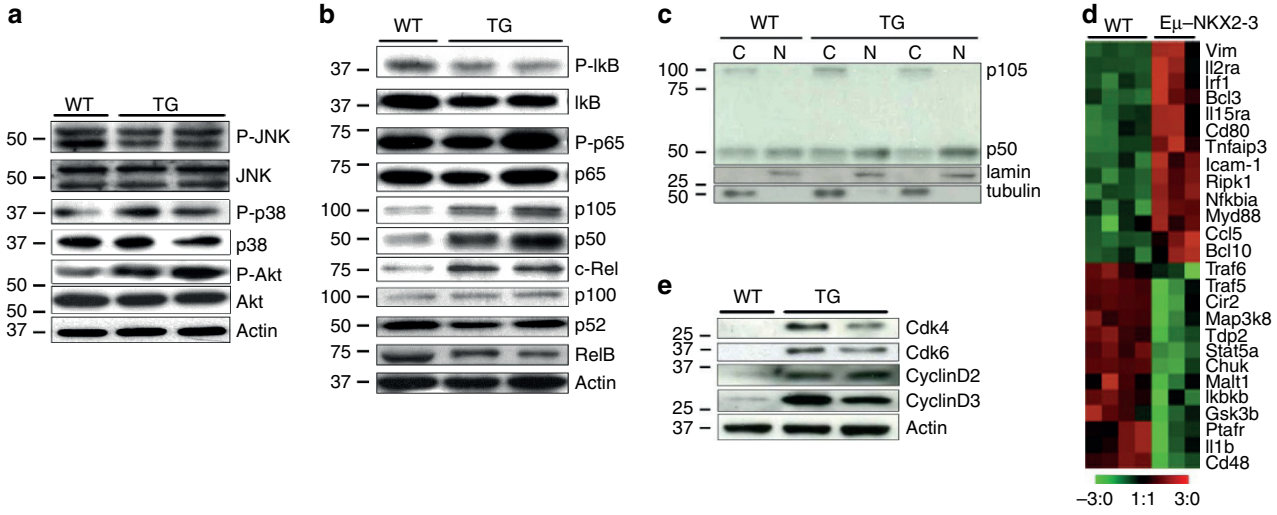
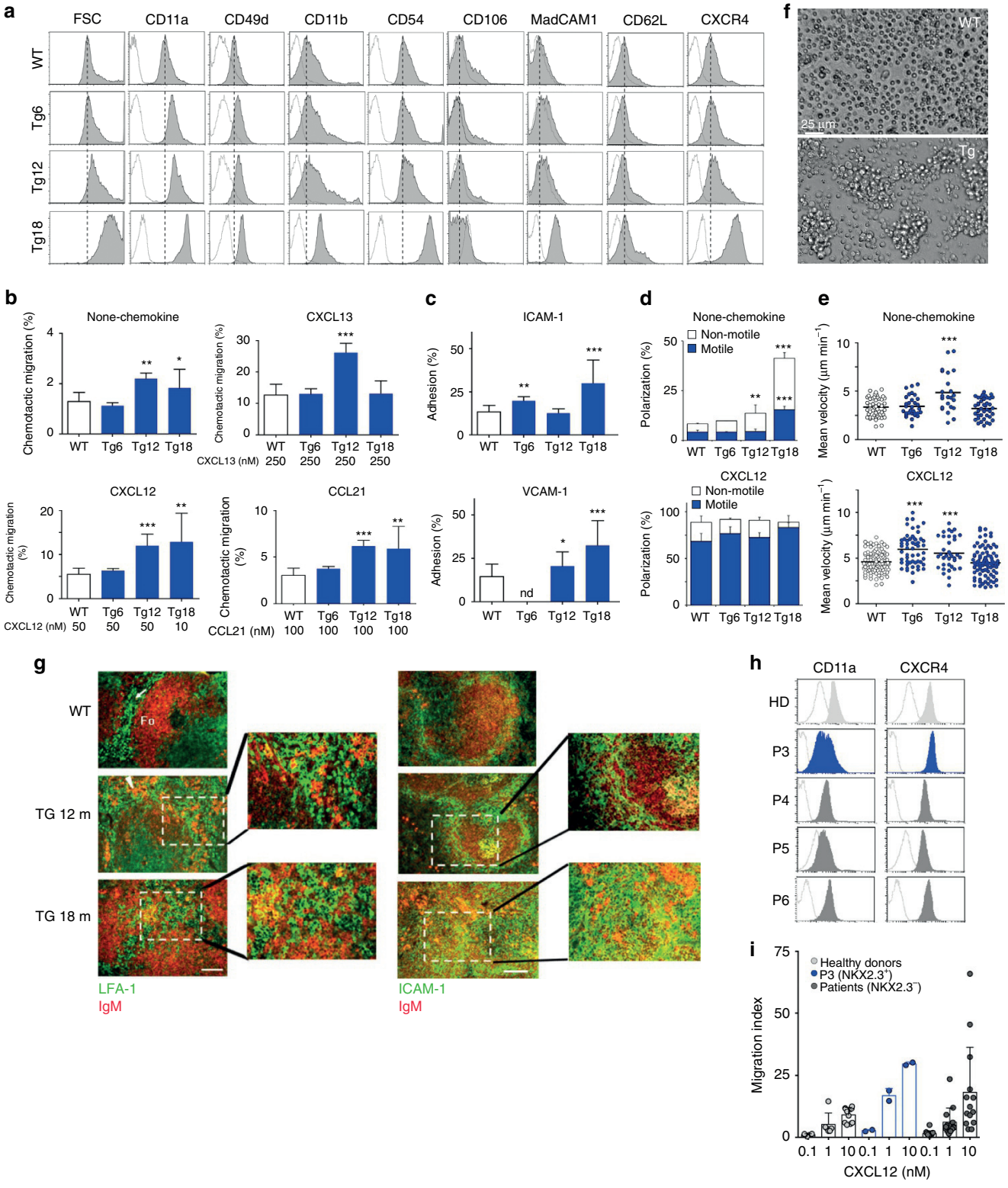


Figure 5 | NKX2-3 induces activation of BCR and downstream signalling pathways in mouse B-cell lymphomas. (**a**) Western blot analysis showed increase in AKT phosphorylation levels in splenic CD19$^+$ cells isolated from 18-month-old transgenic (TG) mice in comparison to WT cells, whereas similar levels of phosphorylation of Jnk (p36/p54) and p38 proteins were detected. (**b**) Western blot analysis showed similar RelB and p100/p52 expression in transgenic and WT cells, excluding activation of non-canonical NF-κB pathway. However, expression of p50 and of c-Rel proteins was higher in 18-month-old B-cell lymphoma cells in comparison to WT cells, indicating triggering of the canonical NF-κB pathway. Two representative transgenic and WT CD19$^+$ splenic B cells are depicted. (**c**) Western blot analysis of p105 and p50 proteins in cytoplasmic (C) and nuclear (N) extracts from WT and 18-month-old transgenic CD19$^+$ splenic cells. (**d**) Heat-map image showing gene components of the NF-κB pathway and NF-κB target genes (http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes) differentially expressed between 18-month-old splenic B-cell lymphoma cells and WT splenic CD19$^+$ B lymphocytes. (**e**) Western blot analysis of cell cycle proteins in splenic CD19$^+$ cells isolated from WT and transgenic mice.

family have been involved in the development of solid tumours and T-cell leukaemias[8,21], ectopic expression of NKX2-3 in mouse B lymphocytes induced the development of clonal B-cell neoplasms closely mirroring the spectrum of human NKX2-3-expressing lymphomas. These findings define the homeobox NKX2-3 family protein as a *bona fide* oncogenic driver in marginal-zone B-cell lymphomagenesis in human and mice.

A better understanding of the cellular and molecular mechanisms underlying the development of marginal-zone lymphomas will facilitate the diagnosis and treatment of this heterogeneous disease[27,37,43]. Currently, there are few diagnostic and prognostic markers for patients with marginal-zone lymphomas, and there is not a clear molecular target for these tumours, particularly for SMZL. In addition, despite the fact that there are animal models mimicking the principal features of



human MALT lymphoma[44], such models are lacking for SMZL. We propose that the Eμ-*NKX2-3* mice fully recapitulate the main cellular, histopathological, molecular and genetic features of human SMZL, thus representing a valid tool for studying the functional biology and therapy of this lymphoma entity. The fact that lymphomas from these Eμ-*NKX2-3* mice exhibit activation of the BCR pathway is particularly interesting, because virtually all patients with marginal-zone lymphomas show constitutive BCR signalling, which is triggered by different inflammatory and molecular mechanisms[45]. However, in a number of cases, the cause of BCR activation remains elusive. We show that in a small fraction of tumours, NKX2-3 plays a role in activating BCR signalling, which may be through a direct effect on Lyn/Syk tyrosine kinases. However, it is also possible that alternative indirect mechanisms, for instance antigenic stimulation, are required during the transformation process. Indeed, we have used the MD4 BCR transgenic mouse model (in which all B cells express a BCR specific for hen egg lysozyme) to evaluate the putative role of BCR activation by autoantigens in the tumour development process. Analysis of three NKX2-3 transgenic mice MD4 negative (polyclonal BCR repertoire) and three transgenic mice NKX2-3 MD4 positive (monoclonal BCR repertoire) at 6 months of age showed lower levels of activated Syk in the latter group in comparison to the MD4-negative mice. These data suggest that antigen stimulation of the BCR may have a role in the lymphomagenesis observed in our mouse model (Supplementary Fig. 4d).

Eμ-*NKX2-3* mice exhibited a sequential model of lymphoma development. Constitutive BCR signalling was observed from 6 month of age, which was followed by significant molecular and cellular dynamic changes in B cells that facilitated their homing to spleen tissues, whereby they became adherent and were retained by stromal cells to accumulate and progressively develop non-clonal tumours. At ~18 months, B cells acquired genomic rearrangements that activated NF-κB and PI3K-AKT signalling pathways, which promoted cell proliferation and survival, progressively inducing the formation of clonal B-cell lymphomas. Although constitutive activation of BCR and downstream signalling pathways has been implicated in human marginal-zone lymphoma development[34,39,40], abnormal migration, homing and adhesion as mechanisms involved in the pathogenesis of these tumours represent novel findings that warrant further investigation. Intriguingly, many patients with SMZL are preceded by an asymptomatic low-count B-cell lymphocytosis that progressively increases in number and in some cases associates with splenomegaly, eventually fulfilling the diagnostic criteria of SMZL[46]. Accordingly, this observation suggests that human SMZL and NKX2-3-induced mouse lymphomas may follow a similar sequential model of tumour development. Although our model recapitulates many aspects of human marginal-zone lymphoma biology, we think it has limitations that include the long tumour latency (which on the other hand reflects the slow development of SMZL observed in patients), and the fact that tumours are triggered by the activation of NKX2-3 in B cells, which is only observed in a fraction of patients with MALT lymphoma and SMZL.

In summary, our study reveals that oncogenic NKX2-3 promotes B-cell lymphomagenesis by activating BCR signalling and disturbing lymphocyte dynamics, and provides an experimental mouse model that recapitulates the major features of human SMZL. Finally, our data suggest that targeting the BCR with inhibitors of Lyn and Syk kinases may be of therapeutic value in patients with marginal-zone lymphomas.

Methods

Human primary samples. A patient diagnosed of marginal-zone lymphoma showed an abnormal karyotype in 4 out of 16 examined bone marrow cells: 46,XY,del(7)(q32q36),t(10;14)(q24;q32). DNA isolated from these cells was used to clone the t(10;14)(q24;q32) by LDI-PCR[24]. In addition, four-hundred eighty samples obtained from untreated patients with mature B-cell malignancies, collected from different institutions participating in the study, were analysed. The study was performed in the accordance with the regulations of the Institutional Review Board of the University of Navarra, and was conducted according to the Declaration of Helsinki principles. Informed consent was obtained from all patients.

Long-distance inverse PCR. LDI-PCR was performed to screen for rearrangements involving the *IGHJ* segments in the lymphoma cells carrying the t(10;14)(q24;q32). Briefly, high-molecular-weight DNA was digested with restriction enzymes chosen from the results of DNA blot to yield small DNA IGHJ fragments. Phenol/chloroform extraction was performed to remove residual enzymatic activity, and 0.4 μg of digested DNA was then ligated at 15 °C overnight in a total volume of 500 μl with 5 U of T4 DNA ligase (Promega). The ligated DNA was then purified using the Wizard DNA clean-up system (Promega) and eluted in a final volume of 40 μl. Primers were designed within the *JH* and *IGH* enhancer regions based on published sequences (Supplementary Table 7), so that the amplification products would include short stretches from these regions in addition to the rearranged or translocated regions 5′ of *JH*. In addition, restriction sites to permit forced cloning into plasmid vectors were introduced[24].

Quantitative real-time PCR. Total RNA was isolated from harvested cells and patient samples using TRIzol (Invitrogen). RNA was converted into cDNA using random hexanucleotides and the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). In human samples, *NKX2-3* expression was measured using a TaqMan probe (Hs00414553_g1, Applied Biosystems) normalized to *GAPDH* (Hs99999905_m1, Applied Biosystems). In mouse samples, *Nkx2-3* gene expression quantification was performed using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) normalized to mouse *Gapdh*. Quantitative real-time–PCR was performed in the 7300 Real-Time PCR System with universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). For each sample, a ΔCt value was calculated as the threshold cycle (Ct) value of the *NKX2-3/Nkx2-3* gene (target) minus the Ct value of *GAPDH/Gapdh* (control). A cutoff value for considering a sample positive for *NKX2-3* expression was calculated as four-times the standard deviation (s.d.) of the

Figure 6 | Phenotypic analysis and characterization of cell dynamics in NKX2-3-expressing B cells. (**a**) Representative flow cytometry profiles (grey filled histogram) of forward side scatter (FSC) and the indicated molecules at the surface of WT B cells and NKX2-3 transgenic (Tg) B cells of the specified ages (Tg6, 6-month-old mice, Tg12, 12-month-old mice and Tg18, 18-month-old mice). Dashed black line, maximum expression levels in WT B cells. Dotted histogram, isotype control. (**b**) Migration frequencies of WT and transgenic B cells of the indicated ages in Boyden chambers in the absence or presence of CXCL12, CXCL13 or CCL21. Data are the mean ± s.d. ($n=4$). Error bars represent standard deviation (s.d.) in all cases. (**c**) Frequency of adhesion to ICAM-1 (top) or VCAM-1 (bottom) containing artificial membranes of WT and transgenic B cells. Data are the mean ± s.d. ($n=2$). (**d**) Cell polarization frequencies, indicating the fractions of non-motile and motile cells, of WT and transgenic B cells settled on ICAM-1-membranes in the absence (top) or presence of CXCL12 chemokine (bottom); data are the mean ± s.d. ($n=2$). (**e**) Mean velocity values of motile WT and transgenic B cells; data are derived from two experiments and each dot is a single cell. (**f**) Representative wide-field images of WT B cells (top) and transgenic B cells (bottom) after 24 h of culture. (**g**) IF analysis of WT and transgenic spleens from 12- and 18-month-old mice: (left) Clustering of B cells in LFA-1$^+$ compartments in ageing Eμ-*NKX2-3* mice: in WT mice (top) LFA-1$^+$ (green) cells are restricted to the red pulp (arrow), whereas the follicles stained with anti-IgM (red; Fo) are devoid of such cells. Scale bar, 200 μm. (**h**) Representative flow cytometry profiles (filled histogram) of the indicated molecules at the surface of human B cells from healthy donors (HD) and patients (P3, patient positive for NKX2-3 expression; P4, P5, P6, patients negative for NKX2-3 expression). Dotted histogram, isotype control in each case. (**i**) Migration index of human B cells from healthy donors ($n=4$), P3 (patient positive for NKX2-3) and patients negative for NKX2-3 expression ($n=7$) in response to gradients of CXCL12.

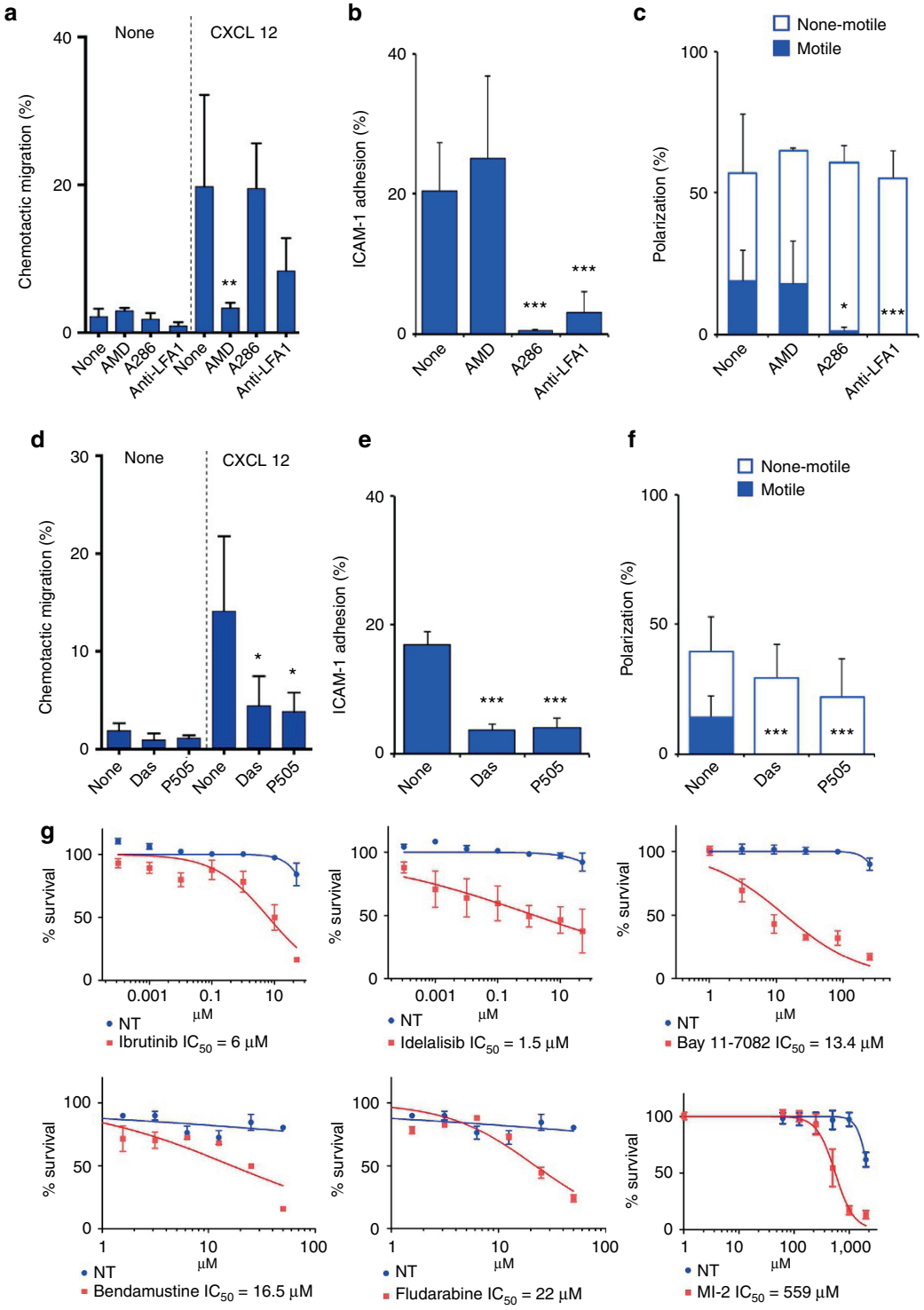


Figure 7 | Functional characterization of cell dynamic changes in *E*µ-NKX2-3 transgenic mice. (**a**) Migration frequencies of transgenic B cells non-treated (none) or treated with the indicated chemical inhibitors (AMD, CXCR4 antagonist, 10 µM; A286, LFA-1–ICAM-1 interaction inhibitor, 10 µM; anti-LFA1, blocking antibody anti-mouse CD11a, 1 µg ml^{-1}) in Boyden chambers in the absence (none-chemokine) or presence of CXCL12 (10 nM). Significance levels of changes are indicated (two-tailed Student's *t*-test: $*P<0.05$, $**P<0.001$, $***P<0.0001$) in all **a**–**f** cases. (**b**) Frequency of adhesion to ICAM-1-containing artificial membranes of transgenic B cells none-treated or treated with the indicated chemical inhibitors. (**c**) Cell polarization frequencies, indicating the fractions of non-motile and motile cells, of transgenic B cells none-treated or treated with the indicated chemical inhibitors and settled on ICAM-1-membranes in the absence of CXCL12 chemokine. Data in **a**,**b**,**c** are the mean ± s.d. ($n=4$). (**d**) As in **a** using the chemical inhibitors Dasatinib (Das, 1 µM; Lyn inhibitor) and P505-15 (P505, 1 µM; Syk inhibitor). (**e**) As in **b** using the indicated inhibitors. (**f**) As in **c** using the indicated inhibitors. Data in **d**,**e**,**f** are the mean ± s.d. ($n=3$). (**g**) Survival of splenic Eµ-*NKX2-3* CD19^{+} B-cell lymphoma cell cultures incubated during 24 h with the BTK inhibitor (Ibrutinib), the PI3K inhibitor (Idelalisib), the MALT1 proteolytic inhibitor (MI2), the NF-kB inhibitor (Bay11-7082), bendamustine and fludarabine at increasing concentrations. Non-treated cells (NT) were incubated with dimethylsulphoxide (DMSO). IC_{50}, half maximal inhibitory concentration. Error bars indicates s.d.

$2^{-\Delta Ct}$ value of NKX2-3 expression in the human CD19$^+$ and CD34$^+$ cell samples. The primers used are listed in Supplementary Table 7.

Fluorescence *in situ* hybridization. FISH was applied to screen for chromosomal breakpoints involving the *NKX2-3* gene locus (chr10: chr10:101,292,690-101,296,280, hg19) using a break-apart assay consisting of two differently labelled BAC clones CTD-3188C19 (chr10:101075221-101281059, hg19) and RP11-157O7 (chr10:101308986-101475976 hg19)[47], following previously reported methods[48]. Screening for *NKX2-3* gene abnormalities was performed on fixed cells left over from routine cytogenetic studies of 86 mature B-cell leukaemias and lymphomas, including 37 cases with chromosomal changes affecting bands 10q22-q26, 39 cases with other cytogenetic abnormalities, and 10 cases with a normal karyotype. The *NKX2-3-TCRA/D* fusion was investigated using a triple colour assay, which included the *NKX2-3* probes described above labelled in spectrum aqua and the commercial LSI TRA/D Dual Color Break apart Rearrangement Probe (Abbott/Vysis).

Generation of NKX2-3 mAb. A human *NKX2-3* cDNA clone encoding full-length NKX2-3 protein was used to bacterially express a GST fusion protein for immunization in two Wistar rats, using previously reported methods[49]. The hybridoma fusion generated seven mAbs, two of which were selected because they selectively reacted with NKX2-3 and not with other NKX2 family proteins by ELISA. Both showed a similar nuclear staining pattern in splenic endothelial cells by IHC, but did not work for western blot analysis. The NKX2-3 5GAL-454C/H9 clone was selected for further studies.

IHC and western blot analyses. Paraffin-embedded mouse and human lymphoma tissues included in the study were centrally reviewed by at least two expert haemopathologists (listed as authors in this study), and diagnosed according to the World Health Organization criteria[29]. For comparative studies, age-matched WT mice were used. For western blot analysis, equal amounts of total protein (10–50 μg) were separated on SDS–polyacrylamide gel electrophoresis, and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated with primary antibodies, followed by secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, which were detected by chemiluminescence (Applied Biosystems and Pierce, respectively)[50]. IHC and western blot antibodies are listed in Supplementary Table 8. In the figures, molecular-weight size markers in kDa are shown. When indicated, the quantifications of bands from western blot was performed by densitometry, and subsequent analysis using Quantity One software (Bio-Rad).

Generation and characterization of NKX2-3-deficient mice and Eμ-NKX2-3 transgenic mice. Knock-out mice for *Nkx2.3* gene have been previously reported[11]. Human NKX2-3 cDNA was cloned into the *Hin*dIII *Sac*I of the pEμSR vector (kindly provided by Jerry Adams), to obtain the pEμSR-NKX2-3 vector. A 4.455-bp *Pci*I *Aat*II fragment containing the *NKX2-3* gene was isolated from the pEμSR-NKX2-3 vector, purified and injected into fertilized oocytes of C57BL/6 mice background. Mice were crossed onto C57BL/6 genetic background and housed in the specific pathogen-free animal facilities of our centre. All the experiments were conducted with protocols approved by the Ethical Committee of Animal Experimentation of the University of Navarra. Mice were characterized for transgene integration by PCR and Southern blot (Supplementary Fig. 1c,d). The PCR was designed to detect the transgene random integration event. The transgene-containing mice showed a PCR product of 586 bp. (Supplementary Fig. 1c). Mice positive by PCR for the presence of the transgene were verified by Southern blot analysis using a 473-bp. JMC-1 probe designed by PCR amplification from the pEμSR-NKX2-3 vector. The hybridization signal of JMC-1 probe indicated the presence of the *Sac*I fragment in the sample, containing the transgene. Supplementary Fig.1d shows the results of the Southern blot analysis performed in eight animals, allowing the selection of the founder mice used in this study. Primers for the genotyping PCR and the probe construction are listed in Supplementary Table 7. *NKX2-3* transgenic females were crossed with MD4 BCR transgenic males (kindly provided by Dr Yolanda R. Carrasco), both in C57BL/6 background and of similar ages (2–3 months old). The F1 generation was genotyped, and born NKX2-3 transgenic MD4-positive mice in comparison to born NKX2-3 transgenic MD4-negative mice were monitored for B-cell activation and/or transformation.

Mouse blood cell count. PB samples were collected from transgenic and WT mice. The following parameters were measured using 40 μl of PB with a HEMAVET HV950FS multispecies hematology instrument (Drew Scientific, Inc.): white blood cells, lymphocytes, neutrophils, monocytes, eosinophils, basophils, red blood cells and haemoglobin.

Measurement of spleen size using ultrasounds. Ultrasound examination of the spleen size was performed in WT and transgenic mice at 4, 12 and 18 months. For each age group, at least eight mice were analysed. The sagital and longitudinal spleen lengths were measured by micro-ultrasound imaging using the Vevo770 high-resolution *in vivo* micro imaging system (VisualSonics), and data were analysed using the Vevo770 v.3.0 software.

Flow cytometry analyses. BM, PB, spleen, thymus and lymph node nucleated cells were extracted from Nkx2-3$^{-/-}$, Eμ-*NKX2-3* and matched healthy C57BL/6 mice. Preparation of the cells for flow cytometry and staining studies was performed according to the standard procedures[44,50]. Cells were acquired in a cytometer FACScalibur (BD Biosciences), and further analysed using the FlowJo 7.6.3 software. Monoclonal antibodies were obtained from BD Biosciences, except for anti-MadCAM-1 antibody (Santacruz Biotechnology), for anti-mouse CCR7 antibody, anti-mouse CD22 and anti-mouse CD279 (PD-1; BioLegend), and for anti-mouse IgM (Jackson ImmunoResearch), and are listed in Supplementary Table 9.

Cell isolation. Cell sorting of different subpopulations in C57BL/6 mice was performed using a FACSAria (BD Biosciences), as reported[44]. The haematopoietic stem/progenitor cell isolation was performed by incubating BM cells with anti-Sca1 and anti-lineage marker antibodies (CD4, CD8, B220, Gr1 and Mac1) to obtain Sca1$^+$Lin$^-$ cells. The remaining BM cell subpopulations were marked as follows: pro-B cells, B220^{low}c-Kit$^+$; pre-B cells, B220^{low}CD25$^+$; recirculating B cells, B220^{high}IgM$^+$ and immature B cells, B220^{low}IgM$^+$. Splenic cell subpopulations were marked as follows: mature B cells, B220$^+$IgD^{high}IgM^{low}, immature B cells, B220$^+$IgD^{low}IgM^{high}, follicular B cells, B220$^+$CD23$^+$CD21^{low} and marginal-zone B cells, B220$^+$CD23$^-$CD21^{high}. Isolation of splenic CD19$^+$ and CD3$^+$ cells from WT and transgenic mice were carried out using the AutoMACs separation system with CD19 or CD3 microbeads (Miltenyi-Biotec), respectively. Isolated cell subpopulations were reanalysed for purity by flow cytometry (purity >98%). For chemotaxis and cell dynamics assays, primary B cells from spleens of WT and NKX2-3 transgenic mice were isolated by negative selection (>95% purity) using pan-T (Thy1.2) dynabeads (DYNAL), as described[42]. Age-matched WT and NKX2-3 transgenic mice were used on each experiment. Human B cells were obtained from PB of healthy donors (buffy coats samples kindly supplied by the Centro de Transfusiones Comunidad de Madrid) and patients by negative selection (>95% purity) using Dynabeads Untouched Human B cells kit (DYNAL) after a Ficoll-gradient centrifugation step.

Cell survival and proliferation. Spontaneous cell survival was determined by incubating isolated WT and transgenic splenic CD19$^+$ B cells at a density of 2.5×10^6 cells per ml during 48 h. Cell viability was assessed by trypan-blue dye exclusion. Apoptosis was measured by Annexin V/propidium iodide staining after treatment with etoposide at 10 μM during 48 h. For BrdU staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, washed with PBS and incubated in 1 N and 2 N HCl, 10 min each, at 37 °C. After PBS washing, cells were treated 12 min with 0.1 M Borate Buffer, and incubated overnight with BrdU mAb following incubation with secondary anti-rat antibody.

***V(D)J* Recombination analysis of mouse B-cell tumours.** *Ig* gene rearrangements were amplified by PCR using primers specific for several V gene families in conjunction with reverse J primers[51]. PCR bands were cloned into a plasmid vector, and eight to ten clones from each purified band were sequenced and analysed for the presence of somatic hypermutation of *Ig* gene sequences.

Gene expression microarray data analysis. Samples were processed according to reported methods[44,50]. The cDNAs were hybridized to the Affymetrix HG-U133 Plus2 arrays in the case of human samples. Mouse samples were similarly processed and hybridized to the Affymetrix GeneChip Mouse Gene 1.0 ST arrays. Raw gene expression microarray data files were submitted to GEO and are available under the accession number GSE49356. Both background correction and normalization were done using RMA (Robust Multichip Average) algorithm. Then, a filtering process was performed to eliminate low-expression probe sets. R/Bioconductor was used for preprocessing and statistical analysis. Linear Models for Microarray Data were used to find out the probe sets that showed significant differential expression between experimental conditions. Genes were selected as significant using a *B* statistic cutoff $B>0$.

Functional and pathway analysis of gene expression signatures. These analyses were performed according to standard procedures[44,50]. Briefly, functional enrichment analysis of Gene Ontology categories was carried out using standard hypergeometric test. The biological knowledge extraction was complemented through the use of Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com), which database includes manually curated and fully traceable data derived from literature sources. To study the biological meaning of the results, enrichment tests with respect to MsigDB gene sets was carried out. To this end, the non-parametric Kolmogorov–Smirnoff rank test was used as implemented in the Gene Set Enrichment Analysis software. Owing to the stochastic nature of this procedure, the test was performed five times and the *P*-values for each gene-set were computed based on 5,000 permutation iterations. The FDR was calculated for

multiple hypothesis testing correction. A hypergeometric test was used to calculate the significance of the overlap between the NKX2-3 signatures and previously published human SMZL transcriptional data set[33,34].

High-resolution comparative genomic hybridization (aCGH) to microarray. Genomic DNA was extracted from CD19$^+$ cells isolated from transgenic ($n=19$) and WT spleens ($n=2$, used as normal hybridization controls). Whole-genome analysis was conducted using a 180-K oligonucleotide mouse aCGH microchip (AMADID 27411, Agilent Technologies), following standard protocols[52]. Microarray data were extracted and visualized using Feature Extraction v10.7 and Agilent Genomic Workbench v5.0 softwares (Agilent Technologies). Regions with DNA copy number abnormalities were detected using ADM-2 (seta s 6) statistic provided by DNA Analytics, with a minimum number of 5 consecutive probes. Genomic build mm7 was used for the experiment. For comparison of the murine lymphoma genomic changes with those present in human disease, two previously published studies including the aCGH analysis of 136 samples from patients with SMZL were used[35,36].

Chemotaxis assays. Purified B cells (3×10^5) resuspended in 100 µl RPMI 10% FCS were added to the upper insert of Boyden chambers (Costar). Then, the upper insert was placed in the lower chamber that contains 600 µl RPMI 10% FCS alone or in the presence of chemokine (recombinant human CXCL12 and recombinant murine CXCL12, CXCL13, or CCL21; Preprotech) at the specified concentration. Cells were incubated at 37 °C for 2 h 30 min, collected from the lower chamber, and counted for 1 min at high flow rate in a FACScalibur cytometer (BD Bioscience). We use Boyden chambers of 3 µm (mouse B cells) or 5 µm (human B cells) pore size; each assay was done per duplicate. Migration frequency was calculated as the percentage of cells from the input that migrate to the lower chamber ((no. of cells at lower chamber/no. of cells at the input) × 100); the input cell number was obtained placing 100 µl of the initial cell suspension in 500 µl PBS and counting them as explained. In the assays with human B cells, Migration Index was calculated as the ratio between the no. of cells at the lower chamber in each chemokine condition and the no. of cells at the lower chamber in the absence of chemokine (basal migration) for each sample (healthy donor or patient).

Calcium mobilization assay. Splenic cells (10^7) from WT and transgenic Eµ-NKX2-3 mice were stained with anti-CD19. Cells were twice washed with RPMI-1640 medium and stained with 2 µM of Fluo-4 AM (Invitrogen) for 30 min. Cells were collected and resuspended in 1 ml of RINGEN buffer (155 mM NaCl; 4.5 mM KCl; 3 mM $MgCl_2$; 10 mM D-Glucose; 5 mM HEPES). When indicated, cells were stimulated with 10 µg ml^{-1} anti-IgM, and later, the buffer was supplemented with 2 mM of $CaCl_2$. Intracellular Ca^{2+} mobilization was measured in real-time by FACScalibur (BD Biosciences) with a laser tuned at 488 nm. Raw data files were analysed using FlowJo 7.6.4 software.

Adhesion assays and time-lapse microscopy on planar lipid bilayers. Artificial planar lipid bilayers containing GPI-linked mouse ICAM-1 or VCAM-1 (density 150 molecules per µm^2) were prepared and used in the study[42,53]. Briefly, membranes were assembled on FCS2 chambers (Bioptechs), blocked with PBS/2% FCS (1 h, room temperature (RT)) and when indicated, coated with 100 nM chemokine immediately before use (30 min, RT). Purified NKX2-3 transgenic and WT B cells were fluorescently labelled with CFSE or SNARF-1 probes (0.1 µM, 10 min, 37 °C; Molecular Probes), mixed at 1:1 ratio, injected into the warmed chamber (4×10^6, 37 °C), allowed to settle on the membranes (5–10 min), and imaging was initiated. Confocal fluorescence, differential interference contrast and interference reflection microscopy (IRM) images were acquired every 8 s for 15 min to evaluate cell dynamics; two or three consecutive videos were acquired in distinct membrane positions per chamber. For cell adhesion measurements, snapshots in different membrane positions were acquired. Assays were performed in PBS/0.5% FCS/0.5 g l^{-1} D-glucose/2 mM $MgCl_2$/0.5 mM $CaCl_2$. Images were acquired on an Axiovert LSM 510-META inverted microscope with a ×40 oil immersion objective (Zeiss). Imaging analysis of cell adhesion and dynamic parameters were done using Imaris 7.0 software (Bitplane) and ImageJ software (NIH). Adhesion frequency was calculated as (no. of cells in contact with the ICAM-1- or VCAM-1-containing membrane (IRM$^+$)/total no. cells in the field) × 100; we calculated polarization and motility frequencies similarly. Assays were performed using NKX2-3 transgenic and WT B cells isolated from mice of same age, and comparing data between them. Similar data were obtained with WT B cells independently of the mouse age.

IF studies. Frozen and acetone-fixed sections were blocked with 5% BSA in PBS for 20 min. Triple label fluorescence for marginal reticular cells, marginal sinus and B cells was performed using FITC-conjugated rat mAb IBL-11 in a cocktail with Cy3-labelled anti-MAdCAM-1 mAb (clone MECA-367) and Alexa Fluor 647-labelled anti-rat IgM (clone B7.6). Three-colour staining for marginal zone macrophages was performed with incubating the sections first with anti-sialoadhesin mAb MOMA-1 (AbD Serotec) in conjunction with FITC-labelled sheep anti-rat IgG (BD Biosciences), where residual binding sites of secondary antibody were blocked with 5% normal rat serum. Subsequently, a cocktail of Cy-labelled anti-rat MARCO (clone IBL-12) and Alexa Fluor-647-labelled anti-IgM was added. Follicular dendritic cells and marginal sinus were identified using a cocktail of FITC-conjugated anti-CD21/35 mAb (clone 7G6 from BD Biosciences) and Cy3-labelled anti-MAdCAM-1 mAb. Staining for VCAM-1 and ICAM-1 expressed by B cells was performed by incubating sections first with unlabelled rat mAbs (anti-VCAM-1 clone 429 from BD Biosciences or anti-ICAM-1 clone YN1/1, kindly provided by Dr Andras K. Szakal) followed by FITC-labelled sheep anti-rat IgG (BD Biosciences) and saturation with 5% normal rat serum. Rat anti-mouse LFA-1 antibody (clone M17/4 from American Type Culture Collection) was used as hybridoma supernatant. B cells were identified using Alexa Fluor 647-labelled anti-rat IgM, for 45 min incubation each at room temperature in a humid chamber. Triple staining for red pulp vessels, marginal sinus and white pulp vasculature was accomplished using a cocktail of FITC-conjugated rat mAb IBL-7/1 against marginal sinus and white pulp vessels, Cy3-conjugated anti-MAdCAM-1 mAb and Alexa Fluor647-labelled IBL-9/2 mAb against red pulp sinuses. After mounting, the sections were viewed under an Olympus BX61 fluorescent microscope. The acquisition of digital pictures with a CCD camera was performed using the analySIS software. IF antibodies are listed in Supplementary Table 8.

Chemical inhibitors. For therapeutic experiments, mouse transgenic B-cell lymphoma cells were incubated at 2.5×10^6 cells per ml for 24 h with the following compounds at increasing concentrations: PI3K inhibitor (Idelalisib; Chemie Tek); BTK inhibitor (Ibrutinib; Chemie Tek); MALT1 proteolytic inhibitor (MI2); NF-kB inhibitor (Bay11-7082; Enzo LifeSciences); Lyn inhibitor (Dasatinib; Selleckchem); Syk inhibitor (P505-15; Selleckchem). For chemotactic and cell dynamics assays, mouse B cells were incubated at 3×10^6 cells per ml for 1 h at 37 °C with the following compounds: CXCR4 antagonist (AMD3100; 10 µm); blocking rat anti-mouse LFA-1 (CD11a) antibody (clon M17/4; 1 µg ml^{-1}; BioLegend); LFA-1–ICAM-1 interaction inhibitor (A286982; 10 µm); Lyn inhibitor (Dasatinib; 1 µm) and Syk inhibitor (P505-15; 1 µm). Then, they were used in the assays keeping the presence of the chemical inhibitor.

Electrophoretic mobility gel shift array. Cells were lysed and nuclear fractions were resuspended in 20 mM HEPES, pH 7.9, 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM ethyleneglycol tetraacetic acid and 20% glycerol. Nuclear extracts (10 mg of total protein) were incubated with a 32p-labelled double-stranded DNA probe corresponding to the consensus NF-κB site (5′ -GGGAATTTCC-3′). Samples were run on a 5% non-denaturing polyacrylamide gel in 200 mM Tris-borate, 2 mM EDTA. Gels were dried and visualized by autoradiography. Supershifts were performed using rabbit polyclonal antibodies specific for p50, p65, c-Rel, p52, RelB or irrelevant anti-GATA1 antibodies (all from Santa Cruz Biotechnology).

Statistical analysis. Overall survival in transgenic mice was defined as the time interval between the date of birth and the date of death. Survival curves were estimated using the product limit method of Kaplan–Meier and were compared using the log-rank test. Two-tailed *t*-tests (normally distributed data) or Mann–Whitney *U*-test (non-normally distributed data) were used for evaluating the significance of differences at gene expression of WT versus transgenic samples, as appropriate. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad). In the case of chemotaxis, cell adhesion and other cell dynamics parameters, statistical analysis and graphs were done using GraphPad Prism 4.0 software. Two-tailed unpaired Student's *t*-test was applied to compare each NKX2-3 transgenic B cells population with its control (WT B cells); $^*P<0.05$, $^{**}P<0.001$, $^{***}P<0.0001$.

References

1. McGinnis, W. & Krumlauf, R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68,** 283–302 (1992).
2. Garcia-Fernandez, J. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat. Rev. Genet.* **6,** 881–892 (2005).
3. Biben, C., Wang, C. C. & Harvey, R. P. NK-2 class homeobox genes and pharyngeal/oral patterning: Nkx2-3 is required for salivary gland and tooth morphogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **46,** 415–422 (2002).
4. Abate-Shen, C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat. Rev. Cancer* **2,** 777–785 (2002).
5. Smith, R. *et al.* Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* **9,** 405–416 (2006).
6. Weir, B. A. *et al.* Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* **450,** 893–898 (2007).
7. Lin, C. *et al.* Nkx2-8 downregulation promotes angiogenesis and activates NF-κB in esophageal cancer. *Cancer Res.* **73,** 3638–3648 (2013).
8. Yamaguchi, T., Hosono, Y., Yanagisawa, K. & Takahashi, T. NKX2-1/TTF-1: an enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword for cancer cell survival and progression. *Cancer Cell* **23,** 718–723 (2013).

9. Nagel, S. *et al.* Activation of TLX3 and NKX2-5 in t(5;14)(q35;q32) T-cell acute lymphoblastic leukemia by remote 3'-BCL11B enhancers and coregulation by PU.1 and HMGA1. *Cancer Res.* **67,** 1461–1471 (2007).
10. Homminga, I. *et al.* Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **19,** 484–497 (2011).
11. Pabst, O., Forster, R., Lipp, M., Engel, H. & Arnold, H. H. NKX2.3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen and mucosa-associated lymphoid tissue. *EMBO J.* **19,** 2015–2023 (2000).
12. Wang, C. C. *et al.* 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 (2000).
13. Tarlinton, D., Light, A., Metcalf, D., Harvey, R. P. & Robb, L. Architectural defects in the spleens of Nkx2-3-deficient mice are intrinsic and associated with defects in both B cell maturation and T cell-dependent immune responses. *J. Immunol.* **170,** 4002–4010 (2003).
14. Pabst, O., Zweigerdt, R. & Arnold, H. H. 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 (1999).
15. Czompoly, T. *et al.* Transcription factor Nkx2-3 controls the vascular identity and lymphocyte homing in the spleen. *J. Immunol.* **186,** 6981–6989 (2011).
16. Balogh, P. *et al.* Distinct roles of lymphotoxin-beta signaling and the homeodomain transcription factor Nkx2.3 in the ontogeny of endothelial compartments in spleen. *Cell Tissue Res.* **328,** 473–486 (2007).
17. Bovári, J., Czömpöly, T., Olasz, K., Arnold, H. H. & Balogh, P. Complex organizational defects of fibroblast architecture in the mouse spleen with Nkx2.3 homeodomain deficiency. *Pathol. Oncol. Res.* **13,** 227–235 (2007).
18. Parkes, M. *et al.* Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genet.* **39,** 830–832 (2007).
19. Fisher, S. A. *et al.* Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nature Genet.* **40,** 710–712 (2008).
20. Arai, T. *et al.* Increased expression of NKX2.3 mRNA transcribed from the risk haplotype for ulcerative colitis in the involved colonic mucosa. *Hum. Immunol.* **72,** 587–591 (2011).
21. Homminga, I., Pieters, R. & Meijerink, J. P. NKL homeobox genes in leukemia. *Leukemia* **26,** 572–581 (2012).
22. Kuppers, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **5,** 251–262 (2005).
23. Willis, T. G. & Dyer, M. J. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* **96,** 808–822 (2000).
24. Willis, T. G. *et al.* Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. *Blood* **90,** 2456–2464 (1997).
25. Kellermayer, Z. *et al.* Divergence of vascular specification in visceral lymphoid organs-genetic determinants and differentiation checkpoints. *Int. Rev. Immunol.* 1–14 (2015).
26. Traverse-Glehen, A., Baseggio, L., Salles, G., Felman, P. & Berger, F. Splenic marginal zone B-cell lymphoma: a distinct clinicopathological and molecular entity. Recent advances in ontogeny and classification. *Curr. Opin. Oncol.* **23,** 441–448 (2011).
27. Baliakas, P. *et al.* Splenic marginal-zone lymphoma: ontogeny and genetics. *Leuk. Lymphoma* **56,** 301–310 (2014).
28. Isaacson, P. G. & Du, M. Q. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat. Rev. Cancer* **4,** 644–653 (2004).
29. Jaffe, E. S. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 523–531, doi: 10.1182/asheducation-2009.1.523 (2009).
30. Sagaert, X. *et al.* Forkhead box protein P1 expression in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas predicts poor prognosis and transformation to diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **24,** 2490–2497 (2006).
31. Camacho, F. I. *et al.* Progression to large B-cell lymphoma in splenic marginal zone lymphoma: a description of a series of 12 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **25,** 1268–1276 (2001).
32. Choi, W. W. *et al.* A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin. Cancer Res.* **15,** 5494–5502 (2009).
33. Troen, G. *et al.* Constitutive expression of the AP-1 transcription factors c-jun, junD, junB, and c-fos and the marginal zone B-cell transcription factor Notch2 in splenic marginal zone lymphoma. *J. Mol. Diagnost.* **6,** 297–307 (2004).
34. Ruiz-Ballesteros, E. *et al.* Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood* **106,** 1831–1838 (2005).
35. Fresquet, V. *et al.* High-throughput sequencing analysis of the chromosome 7q32 deletion reveals IRF5 as a potential tumour suppressor in splenic marginal-zone lymphoma. *Br. J. Haematol.* **158,** 712–726 (2012).
36. Watkins, A. J. *et al.* An integrated genomic and expression analysis of 7q deletion in splenic marginal zone lymphoma. *PLoS One* **7,** e44997 (2012).
37. Martinez-Climent, J. A. The origin and targeting of mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Curr. Opin. Hematol.* **21,** 309–319 (2014).
38. Niemann, C. U. & Wiestner, A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Semin. Cancer Biol.* **23,** 410–421 (2013).
39. Rossi, D. *et al.* Alteration of BIRC3 and multiple other NF-kappaB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. *Blood* **118,** 4930–4934 (2011).
40. Novak, U. *et al.* The NF-{kappa}B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. *Blood* **113,** 4918–4921 (2009).
41. Carrasco, Y. R. Molecular and cellular dynamics at the early stages of antigen encounter: the B-cell immunological synapse. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **340,** 51–62 (2010).
42. Sáez de Guinoa, J., Barrio, L., Mellado, M. & Carrasco, Y. R. CXCL13/CXCR5 signaling enhances BCR-triggered B-cell activation by shaping cell dynamics. *Blood* **118,** 1560–1569 (2011).
43. Thieblemont, C., Bertoni, F., Copie-Bergman, C., Ferreri, A. J. & Ponzoni, M. Chronic inflammation and extra-nodal marginal-zone lymphomas of MALT-type. *Semin. Cancer Biol.* **24,** 33–42 (2014).
44. Vicente-Duenas, C. *et al.* Expression of MALT1 oncogene in hematopoietic stem/progenitor cells recapitulates the pathogenesis of human lymphoma in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109,** 10534–10539 (2012).
45. Shaffer, A. L., Young, R. M. & Staudt, L. M. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu. Rev. Immunol.* **30,** 565–610 (2012).
46. Xochelli, A. *et al.* Clonal B-cell lymphocytosis exhibiting immunophenotypic features consistent with a marginal-zone origin: is this a distinct entity? *Blood* **123,** 1199–1206 (2014).
47. Deloukas, P. *et al.* The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 10. *Nature* **429,** 375–381 (2004).
48. Ventura, R. A. *et al.* FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J. Mol. Diagn.* **8,** 141–151 (2006).
49. Roncador, G. *et al.* Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur. J. Immunol.* **35,** 1681–1691 (2005).
50. Sagardoy, A. *et al.* Downregulation of FOXP1 is required during germinal center B-cell function. *Blood* **121,** 4311–4320 (2013).
51. Cobaleda, C., Jochum, W. & Busslinger, M. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* **449,** 473–477 (2007).
52. Beltran, E. *et al.* A cyclin-D1 interaction with BAX underlies its oncogenic role and potential as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108,** 12461–12466 (2011).
53. Carrasco, Y. R. & Batista, F. D. B-cell activation by membrane-bound antigens is facilitated by the interaction of VLA-4 with VCAM-1. *EMBO J.* **25,** 889–899 (2006).

Acknowledgements

We thank Jerry Adams (WEHI, Melbourne, Australia) for providing the pEμSR vector, Vincent Dubus (Genoway, Lyon, France) for support during transgenic mouse generation, Carlos Ortiz de Solorzano (CIMA, Pamplona, Spain) for spleen ultrasound studies in mice, Lorena Maestre and Giovanna Roncador (CNIO, Madrid, Spain) for generation of NKX2-3 mAbs, Béla Kajtár (Department of Pathology, University of Pécs, Hungary) for human spleen IHC, Maria Dolores Odero, María José Larráyoz (CIMA) and Anne Gardiner (Royal Bournemouth Hospital, Bournemouth, UK), and Maria Antonia Fortuño (Biobanco Universidad de Navarra) for providing patient samples and clinical data, Teresa Flores (IBMCC/HUS, Salamanca) for pathology advice, Elena Ciordia and Eneko Elizalde (CIMA) for excellent animal care, Eduardo Martínez-Ansó (CIMA), Charlotte Cresson (CHU Purpan, Toulouse, France) and Enrique de Álava (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain) for initial studies, and the staff of the cytogenetic and molecular cytogenetic laboratories of the Institute of Human Genetics (Kiel) for technical assistance. This work was supported by Grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, FIS-PI12/00202 (to J.A.M.-C.), RTICC-RD12/0036/0063 (to J.A.M-C.), RTICC-RD12/0036/0068 (to M.J.C and F.P.), RTICC-RD12/0036/0022 (to J.L.F-L.), RTICC-RD12/0036/0070 (to J.C.), RTICC-RD12/0036/0010 (to B.B.), RTICC- RD12/0036/0044 (to M.J.B.) and RTICC-RD12/0036/0069 (to J.M.H.R. and M.G.); by Worldwide Cancer Research project grant 15-1322 (to J.A.M.-C., Y.R.C. and M.-Q.D.); by BFU2011-30097 (to Y.R.C); by MINECO SAF2013-45787-R and Marie Curie Programme FP7-PIIF-2012-328177 (to S.R.); by the French-Spanish CITTIL project (to F.P., X.A., J.A.M.-C., C.B. and P. Brousset); by SAF2012-32810, SAF2014-57791-REDC; PIE14/00066, BIO/SA32/14 and CSI001U14 (to I.S.G); by FIS-ISCIII projects PI13/00160 and PI14/00025, and Fundación Inocente Inocente (to C.C.); by Deutsche Krebshilfe, Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project (to R.S.); by the Institut Universitaire de France (to P. Brousset); by the Broad Medical Research Program of The Eli and Edythe Broad Foundation and the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K108429) (to P. Balogh); by pre- and post-doctoral fellowships from the Foundation for Applied Medical Research (to M.M.V. and E.F.R., respectively); and by a post-doctoral fellowship

from the Basque Government (to I.M.-G.). All Spanish funding is co-sponsored by the European Union FEDER program.

Author contributions

E.F.R.: Designed the study, performed and analysed most of the research, and contributed to the manuscript writing. M.M.-V., L.B., S.V.M.-C., T.A., A.P., P. Balogh, M.-Q.D., I.M.-G., V.S., E.C.-S., C.C., X.S., A.M.M.: Performed and analysed the research. S.R., C.P., R.S., X.A., L.M.P., B.A., A.V.-Z., S.Z., S.M., M.J.C., T. T., C.B., P.B., I.S.-G., J.L.F.-L., R.G.-M., E.P., B.B., A.S., M.J.B., J.M.H.-R., M.G., M.J.T., J.C., A.F., F.P., D.G.O.: Performed the research, contributed valuable material and data. Y.R.C. and M.J.S.D.: Designed the study, performed and analysed the research, and contributed valuable material and data. J.A.M.-C: Designed the study, coordinated the research, analysed the data and wrote the manuscript.

Additional information

Accession codes: Affymetrix GeneChip Mouse Gene 1.0 ST gene expression microarray data files have been deposited in the public GEO database and are available under the accession number GSE49356.

Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/naturecommunications

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

How to cite this article: Robles, E. F. *et al.* Homeobox NKX2-3 promotes marginal-zone lymphomagenesis by activating B-cell receptor signalling and shaping lymphocyte dynamics. *Nat. Commun.* 7:11889 doi: 10.1038/ncomms11889 (2016).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

dc_1678_19

Pathol. Oncol. Res. (2016) 22:421–430
DOI 10.1007/s12253-015-0025-6

ORIGINAL ARTICLE

Isolation and Characterization of a Murine Spontaneous High-Grade Follicular Lymphoma with Restricted In Vivo Spreading – a Model for Lymphatic Metastasis Via the Mesentery

Dóra Vojkovics[1,2] · Zoltán Kellermayer[1,2] · Diána Heidt[1,2] · Martina Mihalj[3] · Béla Kajtár[4] · Dávid Ernszt[5] · Tamás Kovács[5] · Péter Németh[1] · Péter Balogh[1,2]

Received: 12 July 2015 / Accepted: 16 November 2015 / Published online: 19 November 2015
© Arányi Lajos Foundation 2015

Abstract Spontaneous or induced malignant lymphomas in mice are valuable tools for studying human lymphoproliferative diseases, including the mechanism of migration between peripheral lymphoid organs and positioning within distinct tissue compartments. Here we report the isolation and characterization of a novel spontaneous lymphoma from BALB/c mice showing restricted tissue distribution and metastasis. The lymphoma cells display CD19, B220, MHC II, surface IgG2a/kappa chain with V_H7183 rearrangement of the *IgH* gene, indicating their B-cell origin. Serial intraperitoneal injection of primary tumor into both BALB/c and RAG-1-deficient hosts led to the successful propagation of lymphoma. Despite the cytological characteristics of high-grade follicular B-cell lymphoma, the tumor cells (denoted as Bc-DLFL.1) showed significantly lesser spreading to extraabdominal locations upon intraperitoneal passage compared to splenic and mesenteric lymph node expansion. In mesenteric lymph nodes the high endothelial venules contained only few tumor cells, while the lymphatic vessels were almost completely filled with lymphoma cells. Similarly, the LYVE-1-positive lymphatic capillaries within the mesentery were packed with lymphoma cells. These findings suggest that Bc-DLFL.1 cells likely propagate primarily via the lymphatic circulation within the mesentery, therefore this tumor may offer an *in vivo* model to investigate the tumor cell migration via the lymphatic circulation from the peritoneal cavity.

Keywords Mouse · Follicular lymphoma · Lymphatics · Model

✉ Péter Balogh
balogh.peter@pte.hu

[1] Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Szigeti út 12, Pécs H-7624, Hungary

[2] Lymphoid Organogenesis Research Group, Szentágothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary

[3] Department of Physiology and Immunology, School of Medicine Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia

[4] Department of Pathology, University of Pécs, Pécs, Hungary

[5] Department of Pharmaceutical Biotechnology, University of Pécs, Pécs, Hungary

Introduction

Maturation of resting B lymphocytes following antigen stimulation into plasma cells or memory B cells in peripheral lymphoid tissues is a multistep process requiring a tightly regulated sequence of activation, proliferation and clonal selection. In this process uncontrolled expression of a limited number of crucial genes leads to various forms of differentiation blockade, causing abnormal proliferation or survival of transformed B cells. Depending on the phenotypic and genotypic traits, the resulting B-cell malignancies have broadly variable differentiation stages of affected cells, cellular composition and lymphoid and other tissue involvement [1, 2].

For the more efficient diagnosis and therapy of human B-cell lymphomas, various spontaneous B-cell tumors in mice have proved invaluable tools. Earlier these tumors arose either spontaneously or were induced by ionizing irradiation, exposure to chemical agents or viral transformation [3]. Subsequent identification of certain key elements (such as c-myc and Bcl-2) involved in the malignant transformation of B cells in humans combined with the ability to manipulate the mouse genome has greatly expanded the potential research models [4, 5], but also raised the importance of species differences, as various murine models were often found to be different from the parallel human conditions, including both the

dc_1678_19

phenotypic characteristics of malignant cells and the course of the disease [5, 6]. This divergence may reflect important structural differences between the human and mouse lymphoid organs themselves (such as the composition of splenic marginal zone and Peyer's patches, [7]) or the divergent expression pattern of cell surface markers used for the identification of various B-cell subsets [2].

In addition to providing potential in vivo models for human diseases, murine B cell lymphomas may also offer experimental opportunities to study the mechanisms of interactions between the lymphoid and non-hematopoietic constituents in peripheral lymphoid tissues. These include the preserved capacity of lymphoma cells to selectively colonize peripheral lymphoid tissues via organ-selective homing and subsequent positioning within suitable microenvironmental niches, as an analogue to the lymphocyte compartmentalization under physiological conditions, including their capacity to modulate their stromal milieu [8, 9].

In this paper we report the isolation and characterization of a BALB/c mouse-derived novel spontaneous B-cell lymphoma. We demonstrate that the intraperitoneal injection of this lymphoma results in a selective tumor seeding of the spleen and mesenteric lymph node, where the metastasis is formed via the lymphatic vasculature of mesentery. Thus this novel B-cell lymphoma may offer a unique model for studying the in vivo lymphatic propagation of B-cell tumors.

Materials and Methods

Mice

Inbred BALB/c and *Rag1*$^{-/-}$ [10] mice were originally purchased from Jackson Laboratory, and were maintained under SPF conditions at the Department of Immunology and Biotechnology under permits BAI/01/1390–003/2013 (issued by the Baranya County Government Office) and SF/688–18/2013 and SF/27–1/2014 (issued by the Ministry of Agriculture). After their retrieval from the SPF unit the mice were kept under clean conditions with 12 h of light/dark cycles and were provided with water and pelleted food *ad libitum*.

Lymphoma Cell Isolation and Passage

The original tumor was mechanically dispersed using a 70 μm cell strainer (BD Biosciences, Soft Flow Ltd., Pécs, Hungary) and resuspended in DMEM medium (Sigma-Aldrich, Budapest). The tumor cells at the dose of 10^7 cells/recipients in 0.2 ml medium were injected intraperitoneally. For tumorigenicity testing various doses of lymphoma cells were injected intraperitoneally and the mice were observed daily up to 30 days. Mice with terminal stage tumor were sacrificed by cervical dislocation, and their lymphoid and other organs were collected under aseptic conditions in a laminar flow. For further passage mesenteric lymph node (mLN) and spleen were collected and processed by mechanical dispersion through 70 μm mesh size cell strainer (BD Biosciences, Soft Flow Hungary, Pecs).

Antibodies and Reagents

Rat mAb against MHC Class II (IBL-5/22) was produced in our lab [11] and was used as hybridoma supernatant. mAb against peripheral lymph node addressin (PNAd, clone MECA-79) was purchased from BD Biosciences (Soft Flow Hungary, Pecs), anti-LYVE-1 (clone 223,322) and goat anti-mouse Bcl-6 antibodies from R&D Systems (Biomedica Hungária Kft, Budapest). Anti-mouse VEGF-R2/flk-1 mAb (clone Avas12α1) was purchased from BD Biosciences. Anti-mouse CD19 (clone B3B4), anti-mouse CD3 (clone KT-3), anti-mouse LFA-1 (clone M14.4) and anti-mouse L-selectin/CD62L (clone MEL-14) and anti-mouse ICAM-1/CD54 (clone YN1/1) hybridoma lines were obtained from ATCC, anti-α4 integrin mAb (from clone PS/2) was kindly provided by Dr. Eugene C. Butcher. Anti-B220 IgG (clone RA3-6B2 from ATCC) was purified by Protein G chromatography and labeled with FITC or Alexa Fluor 568 dye (Life Technologies Magyarország Kft, Budapest) using standard labeling conditions or used as hybridoma supernatant. FITC-conjugated anti-mouse IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgA rabbit antibodies were purchased from Sigma-Aldrich. Control rat IgG was purified from Wistar rat serum using Protein G affinity chromatography. The unlabeled rat mAbs and the goat polyclonal antibodies were detected with goat anti-rat IgG or donkey anti-goat IgG respectively, conjugated with FITC or PE (BD Biosciences). For immunohistochemical staining the anti-B220 mAb was detected by Histols polymeric anti-rat IgG HRPO-conjugate (Hisztopatologia Kft, Pécs, Hungary).

Flow Cytometry

Single cell suspension prepared from mLN, peripheral lymph nodes (pLN) or spleen of *Rag1*$^{-/-}$ or BALB/c recipients were incubated with monoclonal antibodies against MHC Class II, CD3, CD19, B220 or normal rat IgG and various anti-mouse immunoglobulin isotype antibodies at 10 μg/ml in PBS containing 0,1 % Na-azide and BSA for 30 min followed by two washing steps. The bound antibodies were detected using FITC-conjugated goat anti-rat IgG, followed by washing. The cells were fixed in 1 % buffered paraformaldehyde and the samples were analyzed using a Becton-Dickinson FACSCalibur and the CellQuest Pro software. Typically ten thousand single lymphocyte events as defined by their FSC/SSC characteristics were collected.

dc_1678_19

Histology and Immunohistology

Formol-fixed and paraffin embedded tissues (spleen, mesenteric lymph nodes and mesenterium, thymus, peripheral lymph nodes, liver, kidney, lungs and brain) were processed according to standard histological procedures using hematoxylin-eosin and periodic acid-Schiff staining. For immunohistochemical or immunofluorescent labeling tissues were placed in Killik embedding medium and snap-frozen in plastic molds. Frozen sections at 8 μm thickness were cut with a Leica cryostat and placed onto microscopic slides, and were allowed to dry. After fixing in cold acetone the sections were allowed to dry. The endogenous peroxidase activity was quenched with 0,1 % phenyl-hydrazine hydrochloride in PBS for 20 min followed by washing. After blocking with 5 % BSA in PBS for 20 min anti-B220 antibody was added and incubated for 45 min. After washing polymeric Histols anti-rat IgG-HRPO conjugate was added and incubated for 45 min. After repeated washing the enzymatic reaction was developed using DAKO acetate buffer and diamino-benzidine solution, and mounted using Permount medium.

For dual immunofluorescence after fixation in acetone the slides were allowed to dry, and then rehydrated in 5%BSA-PBS. Next the sections were incubated either with anti-LYVE-1 or anti-PNAd mAbs, followed by FITC-conjugated goat anti-rat IgG. After washing the residual binding sites of the secondary antibody were saturated with normal rat serum at 1:50 dilution for 20 min, followed by adding Cy3-conjugated anti-B220 mAb. After incubation the sections were repeatedly washed in PBS and covered in 1:1 PBS-glycerol, and viewed under Olympus BX61 fluorescent microscope.

Analysis of IgH Rearrangement

DNA from $2x10^5$ lymphoma cells was extracted using Qiagen QIAamp DNA Micro Kit according to the user's instructions. The rearrangement status of Ig heavy chain gene was determined by PCR reaction using degenerate primers for various murine V_H families as described [11]. The amplified products were electrophoresed and visualized using Biotium GelRed. The images were recorded using Bio-Rad Gel Doc XR instrument and Image Lab 5.0.0 software.

Statistical Analysis

Survival data for Kaplan-Meier evaluation were statistically analyzed by logrank (Mantel-Cox) test using GraphPad Prism software.

Results

Identification of a Spontaneous High-Grade B-Cell Follicular Lymphoma

As an incidental finding during the dissection of an aged BALB/c female mouse a soft tissue mass was found surrounding the terminal segment of ileum, accompanied with a robust splenomegaly. Macroscopic observation of the abdominal organs, lungs and brain and also peripheral lymph nodes (inguinal, cervical and brachial) and Peyer's patches did not reveal any gross pathology. To test whether the splenic enlargement may be caused by lymphohematopoietic malignancy the enlarged spleen was removed and single cell suspension was injected intraperitoneally into a cohort of BALB/c recipients. The injected mice showed a sharp decline of physical activities at around 15–18 days after the injection, and after sacrificing the moribund mice we observed enlarged mesenteric lymph nodes (mLN) and spleen, similar to the original tumor-bearing mouse (Fig. 1a). The tumors were removed and processed for serial *in vivo* passage as well as cryopreservation. Histological sections prepared from the mLN and spleen showed a vaguely nodular lymphoid infiltrate composed of centroblast and centrocyte-like atypical cells showing brisk mitotic activity. The ratio of centroblast-like cells was heterogeneous, on average approximately 40 %. The infiltrate replaced the follicles and extended in other lymphoid regions (Fig. 1 b, c and d). PAS staining revealed no positive labeling for the lymphoma cells (not shown).

In both syngeneic BALB/c and allogeneic *Rag1*$^{-/-}$ recipients the tumor cells could efficiently be propagated. We found that injecting large number of cells ($2.5x10^7$ and $2.5x10^6$ cells in each recipient) could uniformly lead to death within 15 days ($p < 0.001$), and even $2.5x10^5$ cells/recipient were sufficient to induce 50 % mortality in BALB/c recipients (Fig. 2) within 30 days ($p < 0.01$).

Given the relative frequent appearance of B-cell derived malignancies in aged BALB/c mice [12], to define the hematopoietic lineage affiliation of the tumor we performed immunohistochemistry using B220 as a B-cell antigen. We found that both the splenic white pulp and the mLN contained homogenously B220-positive lymphoma cells, although at some locations within the splenic white pulp some remnants of the original follicles could be found, based on their more intense B220 expression (Fig. 3a, b). To further verify the B-cell origin of this spontaneous lymphoma we performed flow cytometric phenotyping using CD19 and MHC Class II labeling, using B220 as reference marker in tumor cell suspension obtained from *Rag1*$^{-/-}$ recipients. To rule out T-cell malignancy we also labeled the cells for CD3 and CD5. Positive reactivity for CD19, MHC class II, in addition to B220 and the lack of CD3 expression and CD5 production (not shown) confirmed our earlier immunohistochemical results for B220

dc_1678_19

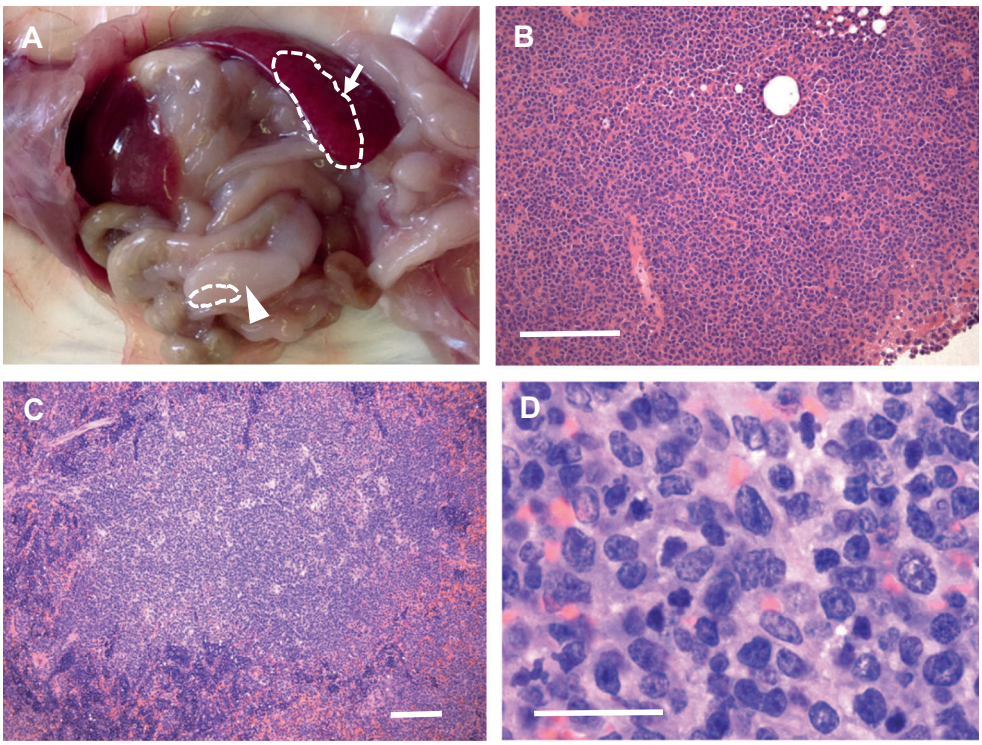


Fig. 1 Macroscopic appearance and histopathology of Bc-DLFL.1 lymphoma. Macroscopic pathology **a** reveals significant splenomegaly (*arrow*) and enlarged mLNs (*arrowhead*), with the dotted lines outlining the borders of organs in control mice. H&E staining of mLN (**b**; scale bar = 200 μm) and spleen (**c**; scale bar = 200 μm) shows lymphoma infiltrate composed of centroblasts intermingled with centrocytes in a representative spleen sample from a BALB/c recipient injected with lymphoma cells (**d**; scale bar = 20 μm)

expression, thus establishing the B-cell origin of this lymphoma (Fig. 3c). Taken together the B-lineage surface markers with the cytological characteristics, this lymphoma corresponds to follicular lymphoma of mixed cell type according to the Bethesda proposal for classification of lymphomas in mice, an entity similar to the high-grade variant of follicular lymphoma category in humans. Correspondingly we denote this tumor as Bc-DLFL.1 (BALB/c-derived Diffuse Large cell Follicular Lymphoma.1).

Immunoglobulin Gene Expression and Production in the Bc-DLFL.1 Lymphoma

Most B-cell lymphomas in both humans and mice express productively rearranged immunoglobulin genes. To test whether such a rearrangement results in detectable cell surface immunoglobulin, we stained the lymphoma cells for IgM, IgD, IgG

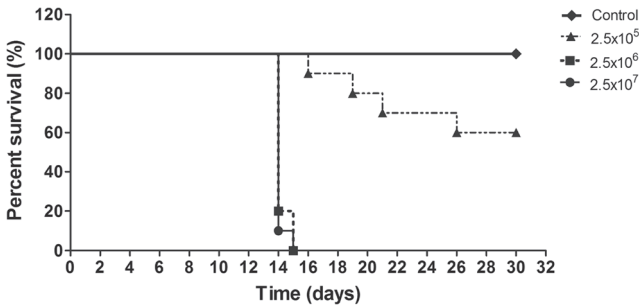


Fig. 2 Dose-dependence of lymphoma engraftment and mortality. Survival of a cohort of BALB/c mice ($n = 10$ recipients/group) following intraperitoneal injection of lymphoma cells at various doses

subclasses and IgA, in addition to kappa light chain. We found positive reactivity for kappa chain and IgG2a without the appearance of IgM, IgD, other IgG classes or IgA (Fig. 4a).

To determine the rearrangement pattern of the Ig heavy chain gene variable region of the Bc-DLFL.1 lymphoma we amplified the genomic DNA using V_H-family specific primer pairs. We found rearrangement of IgH genes within the V_H7183 region in lymphoma cells isolated from both BALB/c and *Rag1*$^{-/-}$ recipients using normal BALB/c mLN as reference sample for successful IgH V-region amplification (Fig. 4b).

The presence of IgG2a/κ surface immunoglobulin indicated isotype switch, usually associated with B cells having undergone germinal center (GC) reaction coupled with Ig affinity maturation, in which process Bcl-6 transcriptional repressor plays a crucial role [13, 14]. As GC-derived B-cell lymphomas in humans overwhelmingly express of Bcl-6, next we investigated the presence of Bcl-6 in Bc-DLFL.1 by flow cytometry. We found Bcl-6 expression in the majority of lymphoma cells, thus further confirming the GC origin of the Bc-DLFL.1 lymphoma (Fig. 4c).

Analysis of Homing Receptor Expression in Bc-DLFL.1 Lymphoma

During the serial intraperitoneal passage of lymphoma cells we noted a robust early enlargement of the mesenteric lymph nodes (mLN) over the largely preserved size and structure of peripheral lymph nodes (pLN), which prompted us to analyze the cell surface adhesion molecules involved in leukocyte homing. We labeled freshly removed lymphoma cell

dc_1678_19

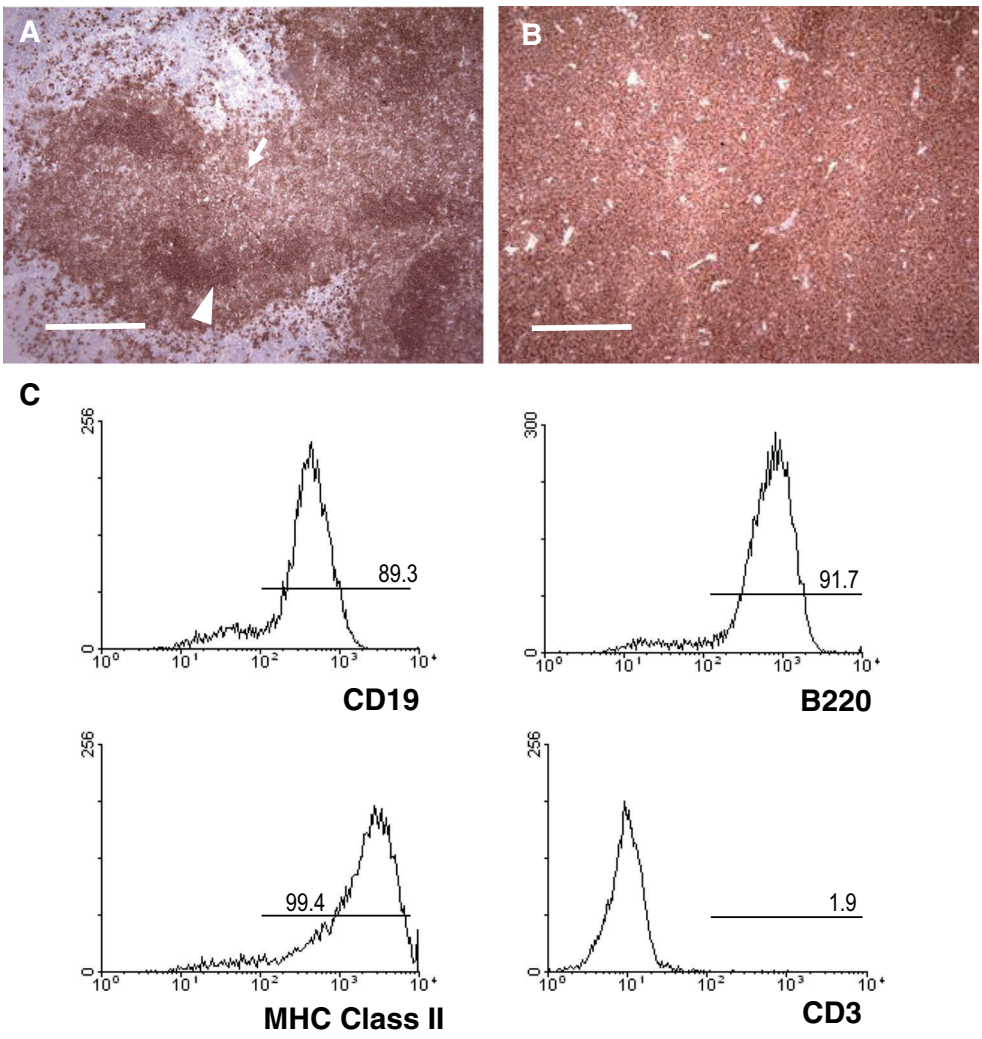


Fig. 3 Immunohistology and cell surface phenotype of Bc-DLFL.1 lymphoma. Anti-B220 staining of a spleen **a** and mLN **b** section from a lymphoma-injected BALB/c mouse reveals a homogenous infiltrate composed of $B220^{+}$ cells, where in the spleen both the remnants of follicles with more intense B220 expression (*arrowhead*) and lymphoma (*arrow*) with a weaker B220 display can be identified (a representative sample from a group of $n = 8$; scale bar = 200 μm). **c** A representative flow cytometric staining of lymphoma cells from the mLN a $Rag1^{-/-}$ recipient indicates the expression of B-lineage associated markers and lack of CD3 ($n = 7$). Numbers in the histograms correspond to the cumulative percentage of positive cells in the fluorescence channel range indicated by the horizontal line

suspension from mLN of $Rag1^{-/-}$ recipients with rat mAbs against LFA-1 (CD11α/CD18), ICAM-1 (CD54), L-selectin (CD62L) and α4 integrin. We found that all four adhesion receptors were produced and displayed on the cell surface, although at different degrees of expression. According to our findings, the lymphoma cells expressed ICAM-1 and LFA-1 molecules at a higher level compared to L-selectin and α4 integrin (Fig. 5).

Metastasis of Bc-DLFL.1 Lymphoma Cells to Mesenteric Lymph Nodes Involves Afferent Lymphatic Vessels of the Mesentery

In addition to the enlarged spleen and mLN in lymphoma-bearing mice, we also noticed a substantial swelling of perivascular adipose cuffs surrounding the arterioles in the mesentery, a bi-layered sheet of mesothelium. HE staining combined with immunohistochemical labeling for B220 revealed that lymphoma cells accumulate both in the reticular perivascular connective tissue and in tight compact clusters in luminal arrangement (Fig. 6a, b and c). This latter arrangement of lymphoma cells in thin-walled dilated lumens raised that lymphatic vessels connecting the intestines and mesenteric lymph nodes could be involved in the expansion of tumor. To confirm the lymphatic identity of these vessels tissue sections from mesentery and mesenteric lymph nodes were reacted with anti-LYVE-1 mAb against lymphatic endothelium and also against VEGF-R2/flk-1 as blood endothelium marker or PNAd as high endothelial cell marker, respectively, in combination with anti-B220 labeling. We found that B220-positive cells were tightly packed within LYVE-1 positive lymphatic vessels in both the mesentery and in the entire lymphatic vasculature of the mesenteric lymph node. In contrast, the blood vasculature (including the PNAd-positive high endothelial venules) of mLNs only rarely contained B220-positive lymphoblasts (Fig. 6d, e and f). From these observations we conclude that the primary dissemination pathway of Bc-DLFL.1 cells from the abdominal cavity towards the mLNs involves the lymphatic vessels connecting the intestines and mLNs.

dc_1678_19

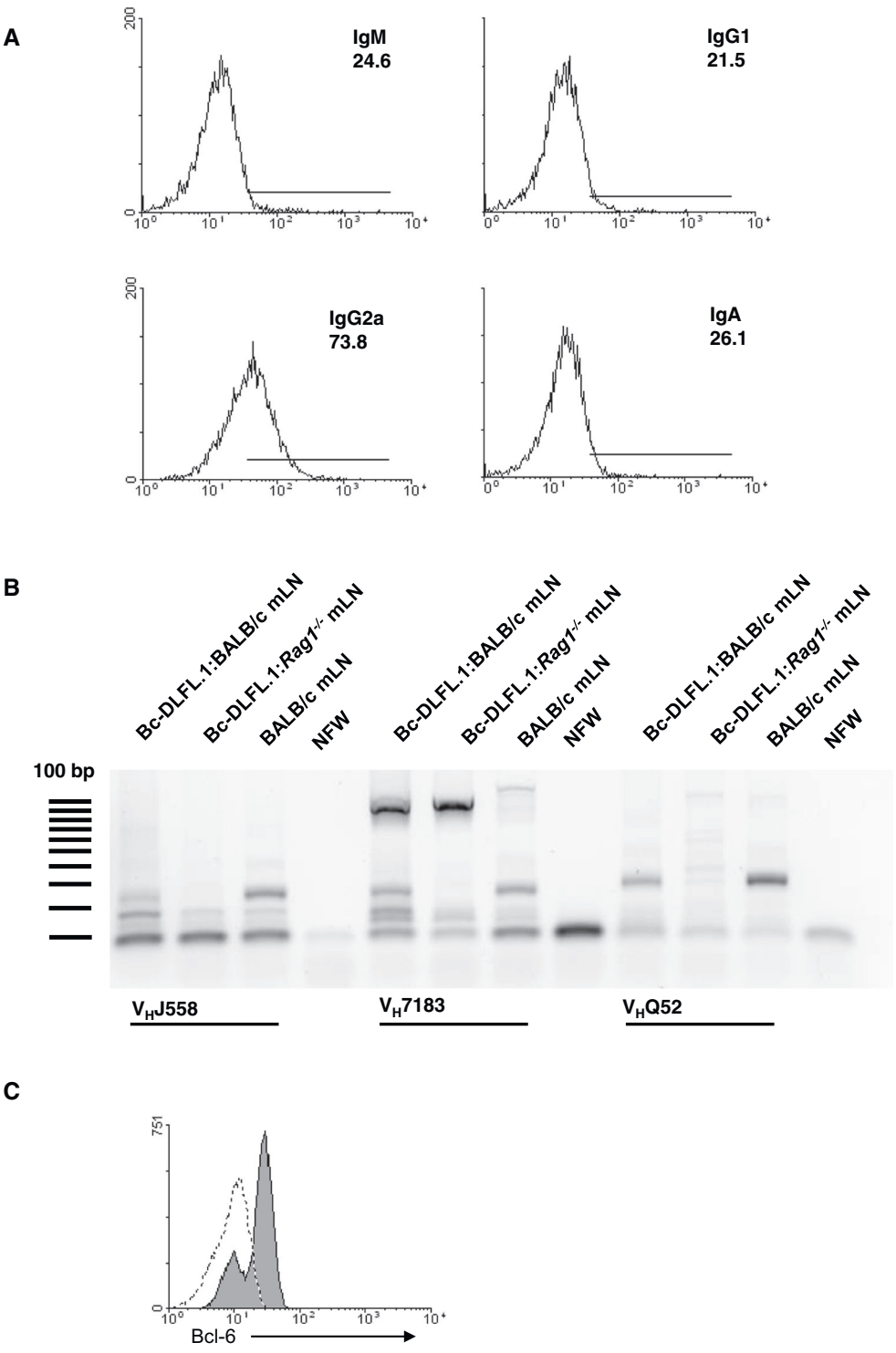


Fig. 4 BcR isotype and IgH V-rearrangement in Bc-DLFL.1 lymphoma. **a** B220-positive cells in *Rag1*$^{-/-}$ recipient mLN sample were stained for cell surface Ig isotypes as indicated, with the mean fluorescence intensities (MFI) shown ($n = 5$), where only IgG2a Ig subclass expression is detectable. **b** PCR analysis of IgH V-region rearrangement demonstrates identical VDJ-rearrangement of V_H7183 family in lymphoma-injected BALB/c or *Rag1*$^{-/-}$ recipient (indicated at the top), with using control BALB/c mLN (NFW, nuclease-free water; $n = 5$). **c** A representative sample of Bcl-6 expression in the lymphoma cells injected in *Rag1*$^{-/-}$ recipients (Bcl-6, grey shade overlaid with control labeling (empty histogram with dotted line; $n = 5$)

Discussion

The present paper describes a new high-grade follicular lymphoma type from a BALB/c mouse. Unlike the majority of other mouse lymphoma models, this tumor arose without any previous induction, such as viral or other microbial infection, exposure to chemical carcinogens, or employing genetic manipulation by introducing mutated proto-oncogenes or other regulatory elements [3], therefore its origin is closer to the human conditions. Its restricted intraabdominal expansion via the mesenteric lymphatic vessels embedded in the mesentery may potentially offer a novel animal model for studying

dc_1678_19

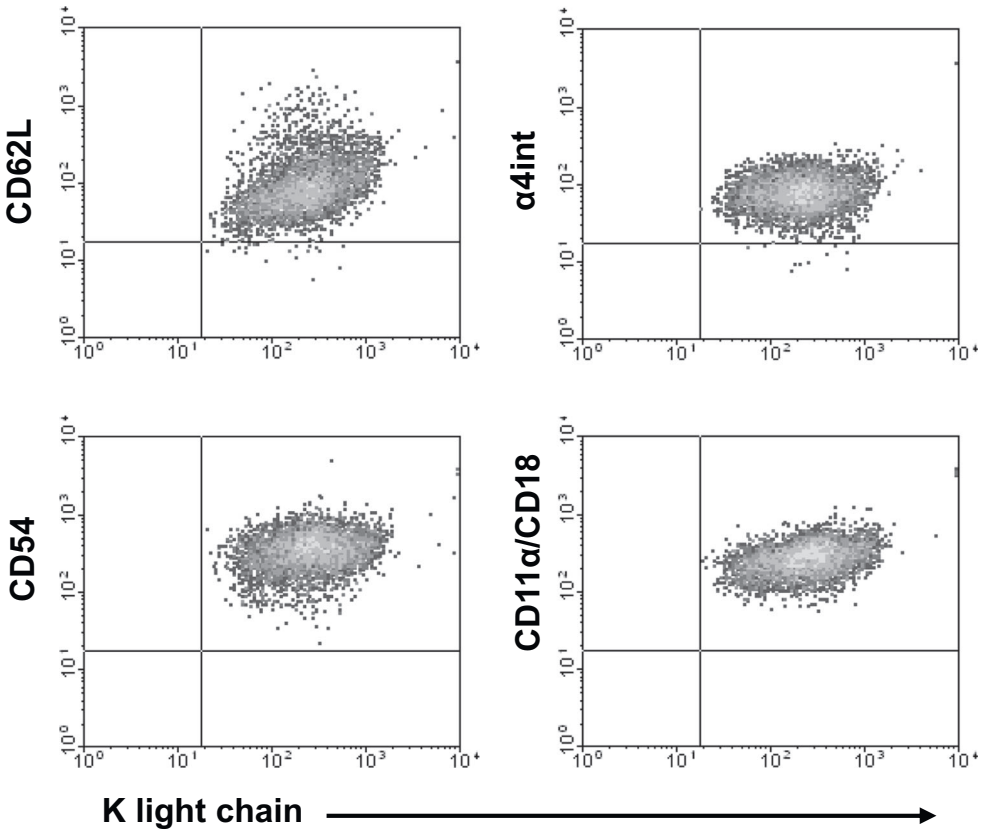


Fig. 5 Adhesion and homing receptor expression by Bc-DLFL.1 lymphoma cells. Lymphoma cells from *Rag1*$^{-/-}$ recipients' mLN were labeled for various adhesion molecules (indicated at the vertical axis) and surface Ig κ-chain together with B220 staining. Density plots depict the expression of adhesion molecule plotted against surface Ig κ-chain of B220^{+} lymphocytes (n = 7)

the dissemination of both normal and pathological B cells via the lymphatic circulation.

The lymphoma was identified as germinal center cell derived lymphoma (mixed cell follicular lymphoma) composed of a mixture of centrocytes and centroblasts. Follicular lymphoma is one of the most common types of human lymphomas and is characterized by a nodular pattern containing recognizable follicular structures. This type of lymphoma is composed of centroblasts and centrocytes, the frequency of the previous determines the grade. Low grade follicular lymphomas have an indolent course, while high grade follicular lymphomas overlap with diffuse large B cell lymphoma. Follicular lymphomas in mice rarely show follicular structures; however, the cytology of the lymphoma cells is similar to human cases. When the ratio of centroblasts to centrocytes exceeds 50 %, the case is identified as centroblastic diffuse large B cell lymphoma; however, distinguishing atypical centrocytes from smaller centroblasts is often difficult [2]. While human follicular lymphoma is usually nodal and frequently involves the bone marrow, in mice follicular lymphoma usually involves the spleen with variable enlargement of mLNs and Peyer's patches. In this lymphoma and in subsequent serial transplantations the Peyer's patches were unaffected, whereas mLNs regularly showed robust lymphoma growth.

Flow cytometric analyses established that the lymphoma cells expressed CD19, MHC Class II, B220, supporting that the malignant transformation affected B cells. Furthermore, the expression of surface BcR of IgG2a/κ light chain isotype also indicated mature B-cell origin, unlike the frequent B-cell progenitor tumors observed in mice with conditional Pax5-deletion [11]. The combined phenotypic characterization and IgH V-region rearrangement analysis revealed that, within the B-lineage, the lymphoma cells most likely have originated from a germinal center stage subset, also supported by the presence of Bcl-6 protein. The analysis of IgH V-region rearrangement in both BALB/c and *Rag2*$^{-/-}$ recipients demonstrated identical IgH recombination involving the V_H7183 family only, despite the extensive interspersion with V_HQ52 family segments [15]. The eventual affinity maturation affecting the V-region has not been further explored, but could reveal affinity maturation against an as yet unidentified antigen. Based on its cytological appearance together with the phenotypic analyses, we designate this lymphoma to the high-grade variant of follicular lymphoma, denoted as Bc-DLFL.1.

The restricted distribution of Bc-DLFL.1 cells following intraperitoneal injection raised the issue of preferential migration of lymphoma cells towards spleen and mLN mediated by cell surface adhesion molecules, and also the availability of survival signals promoting lymphoma growth within these lymphoid organs. The fact that the lymphoma cells could successfully be propagated in both BALB/c and *Rag1*$^{-/-}$ recipients indicates that the lymphoma cells do not need fully structured peripheral

dc_1678_19

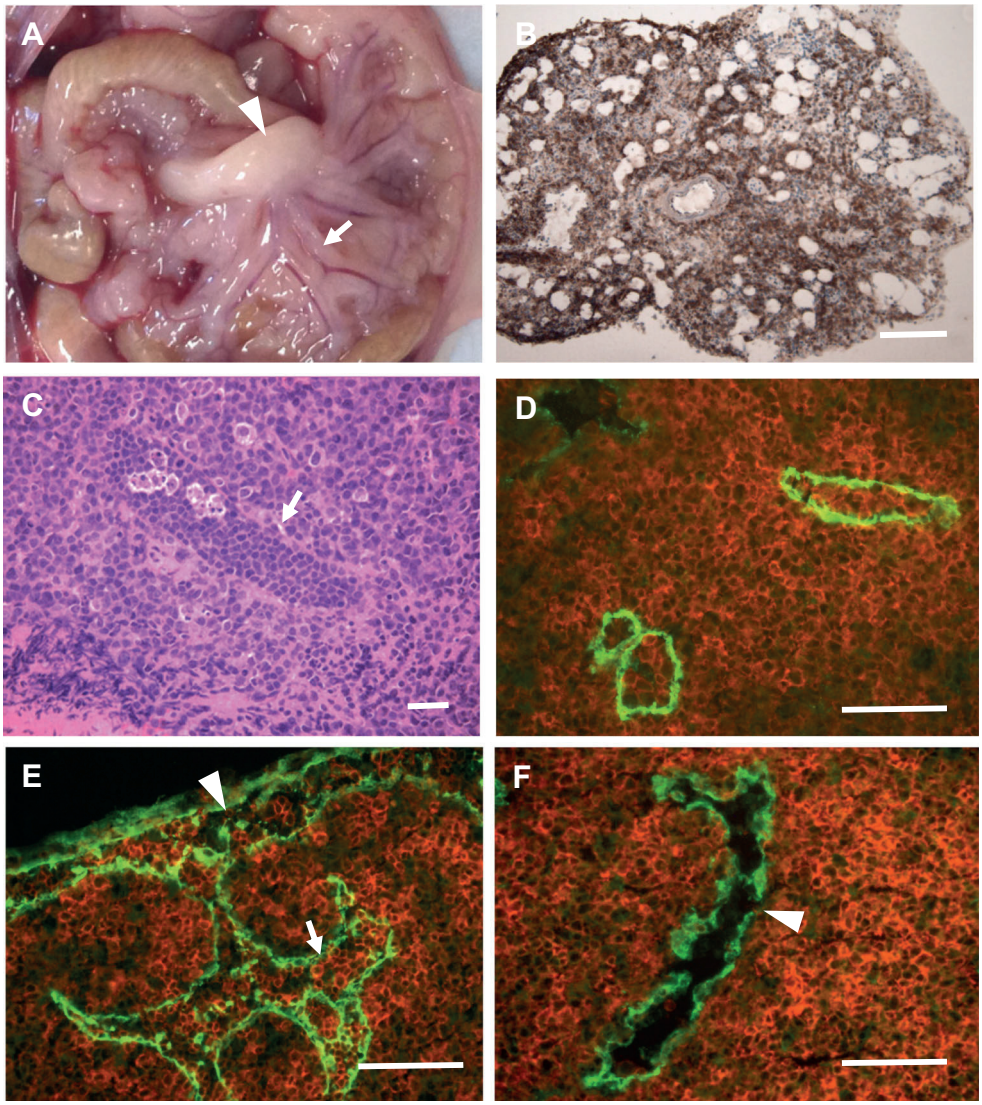


Fig. 6 Mesenteric propagation of Bc-DLFL.1 lymphoma cells involves lymphatic vessels. **a** Perivascular spreading in the mesentery (*arrow*) draining towards the mLN (*arrowhead*) of Bc-DLFL.1 lymphoma cells in BALB/c recipient following ip. injection involves **b** a compact accumulation of B220-positive lymphoma cells (*brown* with *blue* hematoxyline counterstain), also visible in dilated lymphatic vessels (*arrow* in **c**; H&E stain). **d** Dual immunofluorescent staining of mesentery for LYVE-1 (*green*) and B220 (*red*) shows tight clustering both inside and outside the lymphatic capillaries. **e** mLN section stained for B220 (*red*) and LYVE-1 also demonstrates numerous lymphoma cells both in the subcapsular sinus (arrowhead) and the corticomedullary lymphatic sinuses (*arrow*), whereas **f** the PNAd-positive HEVs labeled with MECA-79 mAb (*green*, *arrowhead*) are devoid of lymphoma cells ($n = 5$; scale bars =100 μm)

lymphoid tissues, as $Rag^{-/-}$ recipients lack follicular dendritic cells (FDC), the main stromal constituents in follicles [16], although the Bc-DLFL.1 lymphoma cells express CXCR5 chemokine receptor for the B-cell homeostatic CXCL13 chemokine produced by FDCs [17, 18] (not shown).

Efficient homing to peripheral lymphoid tissues is initiated by specific interaction between recirculating leukocytes and endothelial cell surface adhesion molecules. Of the four adhesion receptors tested we found that, under identical labeling conditions, the expression of ICAM-1 and LFA-1 was higher compared to those of L-selectin and α4 integrin. The combined level of latter two molecules, however, may be sufficient to promote mLN-directed migration, as the high endothelial venules in mLN co-express PNAd and MAdCAM-1 addressins as docking molecules for L-selectin and α4 integrin, respectively, whereas the lower level of L-selectin may reduce the degree of lymphoma homing to pLN where only PNAd acts as homing addressin [19].

Importantly, in addition to the grossly enlarged mLNs, the mesenteric perivascular adipose cuffs also showed an extensive tumor infiltrate. Our findings indicate that, within the adipose-associated vasculature of the mesentery, LYVE-1-positive lymphatic vessels contain large number of lymphoma cells. These lymphatics share numerous phenotypic and transcriptional features with the venous sack-derived lymphatic vessels that drain the skin towards the pLNs; however, their embryonic formation from local mesodermal precursors in the dorsal mesentery is a region-specific process, as it is promoted by the local arteriogenesis with the involvement of CXCR4/CXCL12 interaction [20]. The lymphoma cell-laden mesenteric lymphatics raised the possibility that the lymphoma cells may enter the mLNs via these segments. In the intraperitoneal lymphocyte recirculation under physiological circumstances the main exchange occurs through the milky spots in the omentum [21], but other migratory pathways and locations with distinct integrin requirements and lymphocyte preferences may also be present [22]. The lymphatic

dc_1678_19

vessels of mesentery are engaged in processing the largest fraction of lymph flow from the gut towards the mLNs [23] and may act as such a draining element. In addition, the mesenteric perivascular fat tissue also harbors aggregates composed of type 2 innate lymphoid cells producing Th2-type cytokines that promote peritoneal B1 B-cell survival [24]. However, the direct entry and subsequent migration of intraperitoneally injected cells (either normal resting lymphocytes or Bc-DLFL.1 lymphoma cells) as first steps of lymphatic propagation require further investigation.

Once traversed into the mesenterial lymphatics, leukocytes may enter the mLNs via the afferent lymphatics. In contrast to the homing via the blood endothelial cells within the high endothelial venules (HEVs), this type of lymphoid cell homing to peripheral lymph nodes (pLNs) has only recently been addressed. According to these findings, skin-derived dendritic cells and also lymphatic-derived T cells require CCR7 and ligand binding to several adhesion proteins (ICAM-1 and VCAM-1) for trans-lymphatic migration. Here the migratory cells are also influenced by the activity of S1P1 receptor in determining entry versus egress through the lymphatics, as defined by the combination of sensitization/desensitization effects of CCL19/CCL21 and S1P gradients [25, 26]. During this process T cells are also exposed to IL7 acting as survival factor [27]. The dissemination of germinal center-derived B- lymphoma cells may be related to the activity of sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1PR2), as mutations affecting S1PR2 or its associated partners Gα12 and Gα13 cause impaired confinement and subsequent dissemination of lymphoma cells [28]. It remains to be determined whether the above adhesion proteins or migratory signalization pathways are affected in the restricted in vivo abdominal propagation of Bc-DLFL.1 cells.

Acknowledgments This work was supported by SROP-4.2.2/B-10/1-2010-0029 and CABCOS II (HUHR/1001/2.1.3/0007) project grant at the University of Pécs. Z K 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), and the research grant IBD-0341 from the Broad Medical Research Program of The Eli and Edythe Broad Foundation. DV and ZK are equal first authors.

Compliance with Ethical Standards

Declaration All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

References

1. Deshpande AJ, Buske C, Quintanilla-Martinez L, Fend F (2010) In: Dunphy CH (ed) Molecular oncogenesis in Molecular pathology of hematolymphoid diseases. Springer, New York Dordrecht Heidelberg London, pp. 3–21
2. Morse HC 3rd , Anver MR, Fredrickson TN, Haines DC, Harris AW, Harris NL, Jaffe ES, Kogan SC, MacLennan IC, Pattengale PK, Ward JM (2002) Hematopathology subcommittee of the mouse models of human cancers consortium. Bethesda Proposals for Classification of Lymphoid Neoplasms in Mice Blood 100:246–258.
3. Donnou S, Galand C, Touitou V, Sautès-Fridman C, Fabry Z, Fisson S (2012) Murine models of B-cell lymphomas: promising tools for designing cancer therapies. Adv Hematol 2012:701704. doi:10.1155/2012/701704
4. Kovalchuk AL, Qi CF, Torrey TA, Taddesse-Heath L, Feigenbaum L, Park SS, Gerbitz A, Klobeck G, Hoertnagel K, Polack A, Bornkamm GW, Janz S, Morse HC 3rd (2000) Burkitt lymphoma in the mouse. J Exp Med 192:1183–1190
5. Strasser A, Harris AW, Vaux DL, Webb E, Bath ML, Adams JM, Cory S (1990) Abnormalities of the immune system induced by dysregulated bcl-2 expression in transgenic mice. Curr Top Microbiol Immunol 166:175–181
6. Egle A, Harris AW, Bath ML, O'Reilly L, Cory S (2004) VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. Blood 103:2276–2283
7. Balogh P, Lábadi P (2011) Structural evolution of the spleen in man and mouse in developmental biology of peripheral lymphoid organs Ed. P. Balogh springer-verlag. Berlin Heidelberg 2011:121–142
8. Kim HJ, Kammertoens T, Janke M, Schmetzer O, Qin Z, Berek C, Blankenstein T (2004) Establishment of early lymphoid organ infrastructure in transplanted tumors mediated by local production of lymphotoxin alpha and in the combined absence of functional B and T cells. J Immunol 172:4037–4047
9. Höpken UE, Rehm A (2012) Homeostatic chemokines guide lymphoma cells to tumor growth-promoting niches within secondary lymphoid organs. J Mol Med (Berl) 90:1237–1245
10. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. Cell 68:869–877
11. Cobaleda C, Jochum W, Busslinger M (2007) Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. Nature 449:473–477
12. Frith CG, Wiley LD (1981) Morphologic classification and correlation of incidence of hyperplastic and neoplastic hematopoietic lesions in mice with age. J Gerontol 36:534–545
13. Bunting KL, Melnick AM (2013) New effector functions and regulatory mechanisms of BCL6 in normal and malignant lymphocytes. Curr Opin Immunol 25:339–346
14. Basso K, Dalla-Favera R (2012) Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. Immunol Rev 247:172–183
15. Johnston CM, Wood AL, Bolland DJ, Corcoran AE (2006) Complete sequence assembly and characterization of the C57BL/6 mouse Ig heavy chain V region. J Immunol 176:4221–4234
16. Fu YX, Huang G, Wang Y, Chaplin DD (1998) B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin alpha-dependent fashion. J Exp Med 187:1009–1018
17. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M (1996) A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. Cell 87:1037–1047
18. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, Browning JL, Lipp M, Cyster JG (2000) A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. Nature 406:309–314
19. Rosen SD (2004) Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. Annu Rev Immunol 22:129–156
20. Mahadevan A, Welsh IC, Sivakumar A, Gludish DW, Shilvock AR, Noden DM, Huss D, Lansford R, Kurpios NA (2014) The left-right Pitx2 pathway drives organ-specific arterial and lymphatic development in the intestine. Dev Cell 31:690–706

dc_1678_19

21. Ansel KM, Harris RB, Cyster JG (2002) CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. Immunity 16:67–76
22. Berberich S, Dähne S, Schippers A, Peters T, Müller W, Kremmer E, Förster R, Pabst O (2008) Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots. J Immunol 180:2196–2203
23. Gashev AA (2010) Basic mechanisms controlling lymph transport in the mesenteric lymphatic net. Ann N Y Acad Sci 1207(Suppl 1): E16–E20
24. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S (2010) Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. Nature 463:540–544
25. Braun A, Worbs T, Moschovakis GL, Halle S, Hoffmann K, Bölter J, Münk A, Förster R (2011) Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. Nat Immunol 12:879–887
26. Förster R, Braun A, Worbs T (2012) Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. Trends Immunol 33: 271–280
27. Miller CN, Hartigan-O'Connor DJ, Lee MS, Laidlaw G, Cornelissen IP, Matloubian M, Coughlin SR, McDonald DM, McCune JM (2013) IL-7 production in murine lymphatic endothelial cells and induction in the setting of peripheral lymphopenia. Int Immunol 25:471–483
28. Muppidi JR, Schmitz R, Green JA, Xiao W, Larsen AB, Braun SE, An J, Xu Y, Rosenwald A, Ott G, Gascoyne RD, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Vaidehi N, Staudt LM, Cyster JG (2014) Loss of signalling via Gα13 in germinal Centre B-cell-derived lymphoma. Nature 516:254–258

The Journal of Immunology

Foliate Lymphoid Aggregates as Novel Forms of Serous Lymphocyte Entry Sites of Peritoneal B Cells and High-Grade B Cell Lymphomas

Xinkai Jia,* Fanni Gábris,* Óli Jacobsen,* Gábor Bedics,* Bálint Botz,[†,‡,§] Zsuzsanna Helyes,[†,‡] Zoltán Kellermayer,[*,¶] Dóra Vojkovics,[*,¶] Gergely Berta,[‖] Nándor Nagy,[#] Zoltán Jakus,[,††] and Péter Balogh[*,¶]**

The cellular homeostasis of lymphoid tissues is determined by the continuous interactions of mobile hematopoietic cells within specialized microenvironments created by sessile stromal cells. In contrast to the lymph nodes and mucosal lymphoid tissues with well-defined entry and exit routes, the movement of leukocytes in the peritoneal cavity is largely unknown. In this study, we report that, in addition to the omental milky spots and fat-associated lymphoid clusters, in mice, the serous surface of the mesenteric adipose streaks contains lymphocyte-rich organoids comprised of a highly compacted leaf-like part connected to the adipose tissue that can also efficiently bind B cells and high-grade B cell lymphoma (diffuse large B cell lymphoma) cells. Denoted as foliate lymphoid aggregates (FLAgs), these structures show incomplete T/B segregation and a partially differentiated stromal architecture. LYVE-1–positive macrophages covering FLAgs efficiently bind i.p. injected normal B cells as well as different types of diffuse large B cell lymphoma cells. Within FLAgs, the lymphocytes compartmentalize according to their chemokine receptor pattern and subsequently migrate toward the mesenteric lymph nodes via the mesenteric lymphatic capillaries. The blood supply of FLAgs includes short vascular segments displaying peripheral lymph node addressin, and the extravasation of lymphocytes to the omental and mesenteric adipose tissues is partly mediated by L-selectin. The appearance of i.p. injected cells in mesenteric lymph nodes suggests that the mesentery-associated lymphatics may also collect leukocytes from the fat-associated lymphoid clusters and FLAgs, thus combining the mucosal and serous exit of mobile leukocytes and increasing the range of drainage sites for the peritoneal expansion of lymphoid malignancies. *The Journal of Immunology*, **2020, 204: 23–36.**

The omentum and mesentery are primarily adipose tissues associated with the gastrointestinal organs, harboring an unusual type of peripheral lymphoid tissues (1, 2). Although the leukocytes dwelling in these serous tissues constitute a distinct immunological compartment, they are fully integrated components of systemic immunity, including their extensive traffic to structured peripheral lymphoid organs during activation and differentiation (3, 4). In addition, the specific significance of omental protection during i.p. inflammations or in perforating abdominal injuries has long been recognized and appreciated (5). Although both the peritoneal and pleural cavities are important reservoirs for B1 B lymphocytes, the tissue characteristics of a local specialized microenvironment that allows the survival and interaction within serous lymphoid organs during immune responses and as peritoneal tumor dissemination sites have only recently been investigated in more detail (6).

*Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs, 7643 Pécs, Hungary; [†]Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; [‡]Molecular Pharmacology Research Group, Szentágothai Research Center, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; [§]Department of Radiology, Clinical Center, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; [¶]Lymphoid Organogenesis Research Group, Szentágothai Research Center, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; [‖]Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory, Medical School, University of Pécs, 7643 Pécs, Hungary; [#]Department of Anatomy, Histology and Embryology, Semmelweis University, 1085 Budapest, Hungary; **MTA-SE Lendulet Lymphatic Physiology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences and Semmelweis University, 1094 Budapest, Hungary; and [††]Department of Physiology, *S*emmelweis University, 1094 Budapest, Hungary

ORCIDs: 0000-0003-1767-3642 (O.J.); 0000-0003-4628-2384 (G.B.); 0000-0001-9560-6424 (Z.K.); 0000-0003-3388-0019 (D.V.); 0000-0002-6223-5214 (N.N.); 0000-0002-6304-2369 (Z.J.).

Received for publication July 19, 2019. Accepted for publication October 25, 2019.

This work was supported by Hungarian Science Foundation National Research, Development and Innovation Office Grants 128322 (P.B.) and GINOP-2.3.2-15-2016-00022. N.N. was supported by Hungarian Science Foundation NKFI Grant 124740. Z.K. was 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. B.B. was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences and the ÚNKP-19-4-P-PTE-458 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology. Z.H. was supported by University of Pécs projects GINOP-2.3.2-15-2016-00048 (Stay Alive) and EFOP-3.6.1-16-2016-00004 and University of Szeged project EFOP-3.6.2-16-2017-00006 (Live Longer).

P.B. identified the foliate lymphoid aggregates (FLAgs), conceived and coordinated the research, developed photoconversion, whole-mount anti-FITC and other immunohistochemical protocols, and performed flow cytometric analyses. X.J. performed cell isolation and transfer experiments and the immunohistological analysis of FLAgs, assisted by F.G., Ó.J., and G.B. B.B. and Z.H. performed near-infrared bioimaging. X.J., Z.K., and D.V. carried out and evaluated the quantitative PCR assays. G.B. performed the confocal microscopy imaging of FLAgs. N.N. performed the FLAg electron microscopy studies. Z.J. provided *Prox1*-GFP mice and technical advice on lymphatic endothelial cell analyses. All coauthors contributed by the critical reading of the manuscript, which was written by P.B., Z.K., and X.J.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Péter Balogh, Department of Immunology and Biotechnology, Clinical Center, University of Pécs, Szigeti út 12, H-7643 Pécs, Hungary. E-mail address: balogh.peter@pte.hu

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CTFR, CellTrace Far Red; DAB, diaminobenzidine; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; ECM, extracellular matrix; FALC, fat-associated lymphoid cluster; FLAg, foliate lymphoid aggregate; Fn, fibronectin; FSC, forward light scatter; HEV, high endothelial venule; ILC2, type 2 innate lymphoid cell; LEC, lymphatic endothelial cell; mLN, mesenteric lymph node; MS, milky spots; NIR, near-infrared; PEC, peritoneal exudate cell; pLN, peripheral lymph node; PNAd, pLN addressin; SSC, side light scatter.

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

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1900851

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

As prototypic serous lymphoid organoids, the milky spots (MS) of the omentum were described first. In mice, MS are formed by the clustering of macrophages, dominantly B cells and, to a lesser extent, T cells, without compartmentalization into separate T and B cell zones characteristic of secondary lymphoid tissues (7). MS also function as lymphocyte exit ports from the systemic circulation (8).

More recently, similar leukocyte-rich gatherings (denoted as fat-associated lymphoid clusters [FALCs]) have been identified in the perivascular adipose tissue of mesentery (Supplemental Fig. 1). Regarding their functions, FALCs contain type 2 innate lymphoid cells (ILC2), capable of producing IL-5 and IL-13 in allergic reactions and during protection against helminth infections (9). In FALCs within the mediastinal adipose tissue, the activity of local ILC2 cells can be enhanced by resident stromal cells producing IL-33, leading to protective IgM production by B1 cells (10). Furthermore, omental MS may sustain B cell expansion, leading to germinal center formation coupled with affinity maturation and isotype switch, although without demonstrable follicular dendritic cell meshwork present in peripheral lymphoid organs (7). Similarly to peripheral lymph nodes (pLNs), CXCL13 is a critical chemokine required for B cell entry as well as FALC/MS formation and expansion; however, in contrast to other secondary lymphoid organs, FALC development occurs independently from lymphoid tissue inducer or subsets of ILC3 and LTβR engagement. In contrast, macrophage-derived TNF as well as nonlymphoid tissue inducer/ILC3–type innate lymphoid cells and commensal bacteria are necessary for the appearance of FALCs (9, 10).

These findings indicate that, although intra-abdominal fat-associated lymphoid tissues are anatomically separate and developmentally different from other peripheral lymphoid organs, they, nevertheless, contribute to the systemic immunity, including lymphocyte traffic and distribution. Importantly, their lymphocyte turnover mechanisms and kinetics have only been partially explored, including the access via blood vasculature or lymphatic circulation or migratory routes (11, 12).

In addition to leukocytes, the serous expansion of cancer cells, including colonic, gastric, and ovary tumors, also affects specific regions within the mesentery, in which local chemotactic as well as extracellular matrix (ECM) components may play important roles, including CXCR4/CXCL12 interactions and peritoneal collagen IV and fibronectin (Fn) (6, 13). Further propagation of metastasis may involve dissemination via lymphatic vessels situated within the mesenteric adipose streaks; however, the exact relationship between the cellular entry sites and lymphatic drainage remains to be determined. In addition to these cancers, expansion of high-grade extranodal B cell lymphomas may also lead to peritoneal lymphomatosis and serous effusions causing poor prognosis (14, 15).

In our previous work on a spontaneous mouse high-grade B cell lymphoma, we found a rapid dissemination toward the mesenteric lymph nodes (mLNs) coupled with the lymphomatous transformation of mesentery together with the accumulation of lymphoma cells within the mesenteric lymphatics (16). In the current study, we first investigated the i.p. lymphoma-binding sites of the serous membrane of abdominal cavity, allowing the identification and detailed characterization of a hitherto undescribed variant of serous lymphoid tissues that can efficiently bind i.p. lymphoma cells and normal lymphocytes. Owing to the leaf-like appearance of their main part, connected to omental and mesenteric adipose tissues or peritoneal membrane via a stalk, we chose to denote these structures as foliate lymphoid aggregates (FLAgs). These organoids possess partial lymphoid compartmentalization, which also influences the tissue distribution of high-grade B cell lymphoma subsets, corresponding to the confinement of local homeostatic chemokine dominance. Furthermore, we demonstrate that the removal of LYVE-1–positive macrophages reduces lymphoma cell binding. Finally, we provide evidence that FLAgs can also be destination sites for blood-borne leukocytes via pLN addressin (PNAd)–positive high endothelial venules (HEVs) with the partial use of L-selectin for homing.

Materials and Methods

Mice

Inbred BALB/c, C57BL/6J, and BALB/c^{eGFP}-transgenic mice (17) were maintained at the specific pathogen-free animal facility of the Department of Immunology and Biotechnology. *Prox1*-GFP BAC lymphatic reporter–transgenic mice (18) obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center were maintained in heterozygous form and were used for breeding (*Prox1*-GFP C57BL/6J crossed with BALB/c) F1 mice as recipients for short-term homing. KikGR mice (19) on C57BL/6J background were obtained from The Jackson Laboratory and were backcrossed through 10 generations onto BALB/c background. 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, 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.

Abs and reagents

For flow cytometry rat mAbs against mouse, CD5 (YTS121.5), CD19 (1D3), MHC class II (IBL-5/22), CD21 (7G6), CD23 (B3B4), LFA-1/CD11a/CD18 (M17.7 and IBL-6/2), MAC-1/CD11b/CD18 (M1/70), CD45 (IBL-3/16), B220/CD45R (RA3-6B2), IgM (B7.6), Thy-1/CD90 (IBL-1), ICAM-1/CD54 (YN1/1), MAdCAM-1 (MECA-367), VCAM-1/CD106 (M/K-2.7), and L-selectin/CD62L (MEL-14) were used as hybridoma supernatants. Rat mAb against mouse CD138 (281-2) and PE-conjugated rat mAb against mouse CXCR5 (2G8) were obtained from BD Biosciences (Diagon, Budapest, Hungary) and biotinylated anti-CCR7 mAb (4B12) from BioLegend (Biomedica Hungaria, Budapest, Hungary), the latter detected with streptavidin–PE/Cy5 conjugate (from BD Biosciences). Rat mAb against LYVE-1 (223322) Ag and goat polyclonal Abs against mouse CCL21 and CXCL13 were purchased from Bio-Techne (R&D Systems, Diagon, Budapest, Hungary), FITC-conjugated donkey anti-goat Abs and HRP-conjugated sheep anti-FITC Abs were purchased from SouthernBiotech (Bio-Kasztel, Budapest, Hungary). For immunohistochemistry, rat mAbs were detected using ImmPRESS goat anti-rat IgG-HRP polymeric conjugate (Vector Laboratories, BioMarker, Gödöllő, Hungary). Rabbit anti-Fn and tetramethylrhodamine-labeled goat anti-rabbit polyclonal Abs were purchased from Abcam (Bio-Kasztel, Budapest, Hungary). Chemicals for buffers and histochemical substrates were purchased from Sigma-Aldrich.

Flow cytometry

For the labeling of CXCR5 and CCR7 A20 and Bc.DLFL1, lymphoma cells were incubated with biotinylated or PE-conjugated mAbs against chemokine receptors in mixture with anti-B220 mAb conjugated with Alexa Fluor 647 (prepared at the Department of Immunology and Biotechnology) at room temperature, followed by washing. After further incubation with streptavidin–PE/Cy5 conjugate, the samples were washed and fixed in 1% buffered paraformaldehyde. For other cell surface markers, the lymphoma cells were incubated on ice with rat mAbs listed above, followed by washing and incubation with goat anti-rat IgG FITC conjugate. After fixation, 10,000 events gated on forward light scatter (FSC)/side light scatter (SSC) parameters and B220 reactivity, or KikGR expression combined with CD45 expression, were collected and analyzed using BD FACSCalibur and CellQuest Pro software package.

Whole-mount immunofluorescence and immunohistochemistry

After the removal of the entire gut complex from esophagus until the upper third of rectum, the gut was placed in a petri dish, with its folds arranged, and fixed in 4% buffered paraformaldehyde for 10 min. After rinsing in PBS, a short hematoxylin staining was performed, followed by rinsing in tap water. Either the whole omentum or the mesentery or some selected regions were isolated under stereomicroscopic dissection. For immunofluorescence, the samples were rinsed in PBS containing 0.1% saponin, followed by incubation in PBS containing 0.1% saponin and 5% BSA for 1 h.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

The samples were incubated with FITC anti-IgM, TAMRA anti–Thy-1 or Alexa Fluor 647 anti-CD45 mAbs overnight, followed by extensive washing in PBS containing 0.1% saponin and 0.1% BSA. For indirect immunofluorescence FITC or PE-conjugated anti-rat, anti-goat, or anti-rabbit secondary Abs (adsorbed for mouse IgG) were added and incubated overnight, followed by extensive washing for at least 6 h. Confocal fluorescence images were taken using an Olympus FluoView FV1000 laser scanning confocal imaging system (Olympus Europa SE & Co., Hamburg, Germany).

For immunohistochemistry, the tissue samples were incubated in 2 mg/ml phenylhydrazine hydrochloride in PBS containing 0.1% saponin to quench endogenous peroxidase activity, followed by extensive washing. The tissues were blocked with a 1:1 mixture of 20% normal goat serum and 5% BSA for 1 h, followed by the addition of rat mAbs in the presence of 5% DMSO. For detecting CFSE-labeled lymphoma cells, HRP-conjugated sheep anti-FITC Abs were used. The samples were incubated overnight with continuous agitation, followed by washing in PBS–0.1% saponin. The bound rat Abs were detected using goat anti-rat IgG-HRP conjugate following overnight incubation and were visualized using diaminobenzidine (DAB)–H_2O_2 (Dako, Kromat, Budapest, Hungary). After mounting, the sections were viewed under an Olympus BX61 microscope. The acquisition of digital pictures with a charge-coupled device camera was performed using the ZEN software; the pictures were processed using Adobe Photoshop 6.0 with adjustments for brightness contrast and color balance applied for the entire images.

Transmission electron microscopy

Dissected mouse intestines and harvested FLAgs were fixed overnight at 4°C with 4% buffered paraformaldehyde, washed in PBS, and postfixed with 2% glutaraldehyde, followed by dehydration in graded ethanol. Tissue samples were treated with 1% osmium tetroxide (Polysciences, Warrington, PA) for 2 h and embedded in a Polybed/Araldite 6500 mixture (Polysciences). The 1-μm-thick semithin sections were stained with toluidine blue. The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and studied with a Hitachi Electron microscope type H-7600.

Cell labeling and transfer

A20 cells were cultured in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (EuroClone, Biocenter, Szeged, Hungary) and transduced using replication-defective retroviral vectors containing the bacterial gene for β-galactosidase (LacZ) using the supernatant of PA317 packaging cells (kindly provided by Dr. C. L. Cepko) followed by G418 selection (0.5 mg/ml final concentration; Sigma-Aldrich). LacZ detection was performed using standard X-gal (Sigma-Aldrich) staining. Bc.DLFL1 cells (16) were maintained as serial i.p. passage, where the lymphoma cells were collected from the tumor-laden mLNs. For tracing, the injected cells were either labeled with 5 μM CFSE (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Budapest, Hungary) as recommended, or with 10 μM CellTrace Far Red (CTFR) (20) kindly provided by Dr. K. R. Gee, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR). Normal peritoneal B cells were purified from BALB/c mice using FITC-labeled anti-B220 and anti-FITC beads, followed by separation on VarioMACS (Miltenyi Biotec). For near-infrared (NIR) fluorescence bioimaging of MACS-purified B cells or lymphoma cells, we used lipophilic XenoLight DiR dye (PerkinElmer) as recommended by the vendor. After labeling, the cells were washed in RPMI 1640 basal medium and were injected i.p. at 2×10^6 cells per recipient dosage.

NIR fluorescence imaging

MACS-purified B cells or lymphoma cells (A20 or Bc.DLFL1) were labeled with XenoLight DiR dye, followed by i.p. injection. The fluorescence in the excised gut samples was measured using the IVIS Lumina III (PerkinElmer, Waltham MA) in vivo imaging system with the following parameters: autoacquisition time, F/stop = 1, Binning = 2, excitation: 740 nm, and emission filter: 790 nm. The tissue binding of Bc.DLFL1 lymphoma cells was quantified by NIR analysis of microdissected serous lymphoid organoids placed in Greiner Bio-One CELLSTAR plate after the hematoxylin staining of 4% paraformaldehyde–fixed omentum and mesentery of mice previously injected i.p. with XenoLight DiR–labeled lymphoma cells. The data were processed and analyzed using Living Image software (PerkinElmer) by displaying the fluorescence intensity using the total radiant efficiency ([photons per second per square centimeter per steradian]/[microwatt per square centimeter]) as a pseudocolor overlay image.

KikGR photoconversion and competitive homing

KikGR photoconversion of lymph nodes was performed by placing whole inguinal lymph nodes in a drop of sterile PBS, followed by exposure to a custom-made illumination device (Optics Engineering, Budapest, Hungary) through 6-mm-diameter fiber optics using indium gallium nitride–based 410-nm chip light-emitting diode (no. APGC1 410, 125 mW) for 2×5 min from two sides at room temperature. After the mechanical release of lymphocytes, KikR cells were placed on ice, whereas lymphocytes from unconverted (KikG) lymph nodes were incubated with 10 μg/ml anti–L-selectin/CD62L mAb MEL-14 (21). After incubation, the lymphocytes were washed and resuspended at 1:1 KikG/KikR ratio (with the final donor cell mixture verified by flow cytometry) and were injected in the tail vein in BALB/c recipients at 5×10^7 total cells per recipient in 250 μl volume. The degree of inhibition was determined by the KikG/KiR ratio following anti-CD45 labeling, corrected with the KikG/KikR ratio of donor cell mixture.

Quantitative RT-PCR

Total RNA from inguinal lymph node, omentum, and mesentery homogenates was isolated using NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel). Purity and concentration of RNA was analyzed by NanoDrop. cDNA was synthetized using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). RT-PCR was run on an Applied Biosystems PRISM 7500 machine in duplicates using previously described SYBR Green primers for PNAd core proteins and glycosylation enzymes, creating the MECA-79 epitope (22). Results are shown as fold change of target gene relative to the β-actin housekeeping gene mRNA level, defining the relative value pLN as 1.

Statistical analysis

Data analysis was performed using SPSS 22.0 (IBM). 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 nonnormally distributed data, respectively. Data are represented as mean ± SEM. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Selective binding of high-grade B cells lymphoma reveals preferential homing sites of the serosa for malignant and normal B cells

Our previous study of the spontaneous extrafollicular high-grade B cell lymphoma Bc.DLFL1 in BALB/c mice revealed spreading via the lymphatic capillaries embedded in the perivascular fat pads of the mesentery and subsequent expansion restricted to mLNs and spleen (16). As this condition represented an advanced stage of disease, we aimed at studying the early steps of lymphoma expansion. Therefore, we first investigated the initial adhesion site of the serous surface, followed by the lymphatic propagation and eventual expansion along the perivascular fat. Four hours after i.p. injection of XenoLight DiR–labeled lymphoma cells followed by NIR fluorescence detection, transabdominal imaging revealed three main positive regions, seemingly corresponding to the mLNs and spleen as main target tissues for Bc.DLFL1 seeding in addition to the injection site. However, after opening up the abdomen, we observed that the omentum was the major dominant fluorescent signal-emitting site, together with a series of small foci arranged in a bead-like pattern along the edge of mesenteric fat streaks connected to the middle segment of small intestine, whereas the mLNs and the spleen were label-free (Fig. 1A–F).

Although the focal pattern of lymphoma accumulation within mesenteric fat and the omentum suggested specific tissue-binding pattern to exclude potential labeling artifacts because of the accumulation of lipophilic dye–tagged lymphoma cells in an adipose tissue environment, we performed a similar short-term transfer experiment using CFSE-labeled cells, followed by anti-FITC whole-mount hapten immunohistochemistry. This approach allows light-microscopical inspection over a wide range of magnification of the entire gastrointestinal tract while eliminating high-level autofluorescence of intestines related to alimentary compounds typically emitting at fluorescein spectrum (23). Using anti-FITC–PO immunohistochemical detection, we observed

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

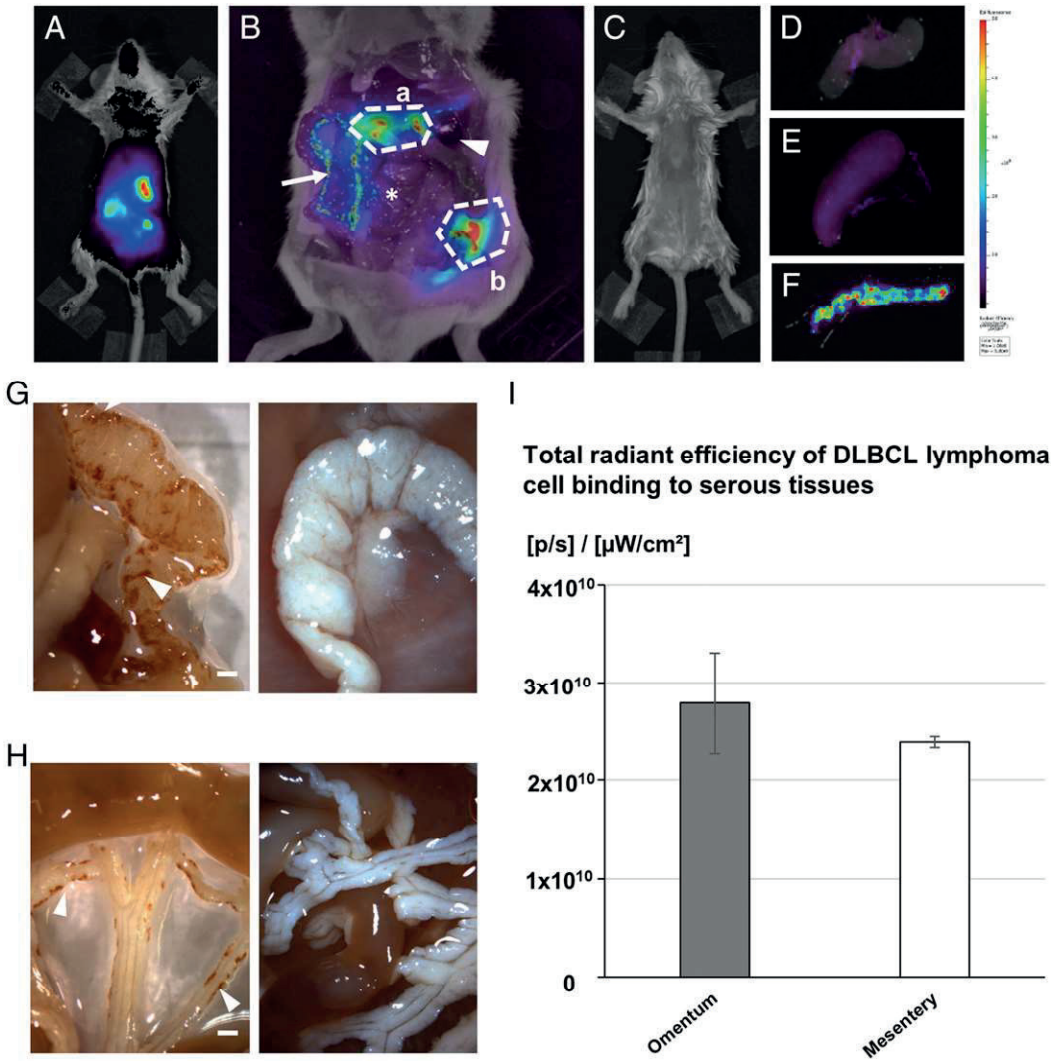


FIGURE 1. In vivo bioimaging of early lymphoma adherence to the peritoneum. (**A**) Transabdominal imaging with three diffusely labeled areas 4 h after injection of XenoLight DiR–labeled Bc.DLFL1 cells; (**B**) several gut-associated bead-like accumulations of lymphoma cells are distinguishable along the mesentery (arrow) and in the omentum (indicated with polygon "a"). Polygon "b" indicates the injection site at the left abdominal region. Note the absence of fluorescence signal in the mLNs (labeled with "*") and spleen (labeled with arrowhead). (**C**) Uninjected sample for imaging setting. (**D**) Ex vivo separated mLN or spleen (**E**) are devoid of detectable signal, while omentum (**F**) shows robust signal emission (representative of three mice). (**G**) Whole-mount immunohistochemical detection of omental clustering of CFSE-labeled Bc.DLFL1 lymphoma cells using anti-FITC–PO detection resulting in brown precipitate (left) 4 h after injection (arrowheads) compared with uninjected control (right). (**H**) Mesenteric adipose tissue stained with anti-FITC–PO resulting in brown precipitate for CFSE-labeled Bc.DLFL1 lymphoma cells (arrowheads) arranged in a chain (left) compared with uninjected sample (right) after anti-FITC immunohistochemistry. Scale bars, 1 mm. (**I**) Quantitation of XenoLight DiR–labeled Bc.DLFL1 lymphoma binding to omentum and mesentery by total radiant efficiency (n = 6 mice per group).

a distribution pattern of CFSE-marked lymphoma cells similar to NIR imaging (Fig. 1G, 1H). Quantitative comparison of omental and mesentery-associated XenoLight DiR fluorescence signal emission indicated that although the individual lymphoma-binding sites are relatively small, their total lymphoma-binding capacity equals that of the omentum (Fig. 1I).

To test whether normal B cells also display similar selective homing sites to the serous surface, MACS-purified peritoneal B cells were labeled with XenoLight DiR dye, and their location was investigated using NIR imaging. We found that, similarly to the distribution of Bc.DLFL1 cells, several B cell foci alongside the mesentery were present 4 h after the injection, in addition to the robust omental localization of peritoneal B cells (Fig. 2A). Interestingly, the quantitative analysis revealed that, compared with the similar diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) retention by omentum and mesentery, the capacity of the entire mesentery for the uptake of normal peritoneal exudate cell (PEC) B cells was significantly higher than that of the omentum (Fig. 2B).

To further investigate the adherence kinetics of lymphocytes to the serous tissues in comparison with the entry into mLNs, we next injected normal BALB/c mice i.p. with lymphocytes isolated from enhanced GFP–reporter mice, followed by their detection in the omentum, mesentery, and mLNs and in the PEC pool at 2, 6, 24, and 48 h after injection. We found that the frequency of residual donor cells in PEC compartment continuously decreased after 6 h. In mLNs, the increase of GFP-positive cells' frequency was first observed at 24 h, and it was maintained until 48 h. Interestingly, we observed a significant reduction after 24 h in the mesentery, whereas in the omentum, the donor cell frequency remained stable until 48 h (Fig. 2C).

These findings establish that, in addition to the omentum, the perivascular adipose streaks of mesentery contain specialized sites that can bind both normal B lymphocytes and high-grade B cell

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

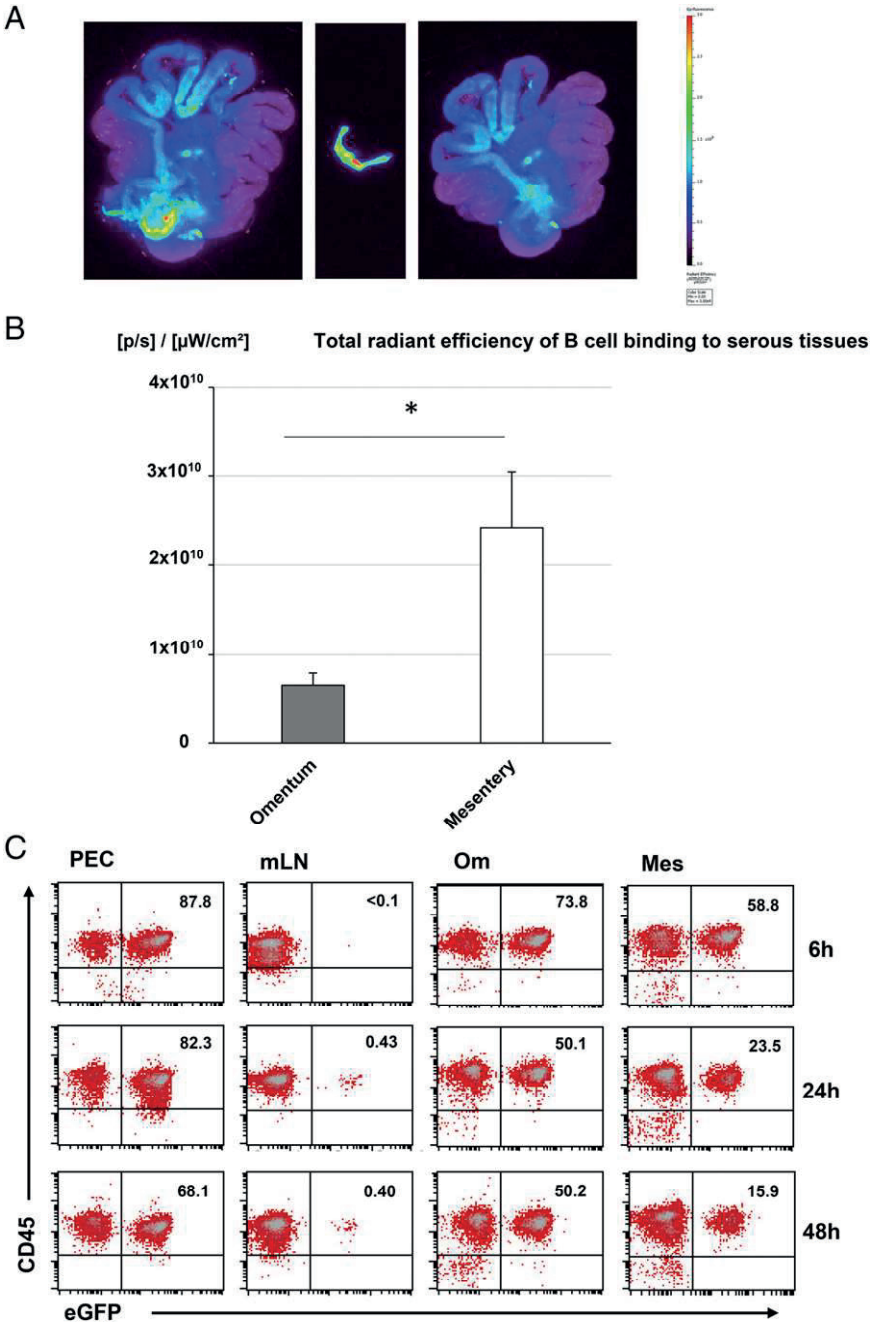


FIGURE 2. Serous accumulation of B cells after i.p. injection. (**A**) Accumulation of XenoLight DiR–labeled and MACS-purified B cells 4 h after injection, detected NIR fluorescence imaging in the whole gut–spleen–omentum (Om) complex (left); isolated Om (middle) and residual gut-spleen complex (right) compared with the intensity range (colored bar reference). Representative sample (n = 5 mice per group) repeated twice. (**B**) Quantitation of the binding of XenoLight DiR–labeled B cells to Om and mesentery (Mes) by total radiant efficiency (n = 6 mice per group). *$p < 0.05$. (**C**) Kinetics of the distribution of lymphocytes from GFP–transgenic BALB/c donors in wild-type recipients in the PEC, mLNs, Om, and Mes at the time points indicated on the right (gated on size/granularity) using CD45/GFP detection by flow cytometry. Numbers indicate the frequency of gated cells in the upper-right quadrant (representative sample from n = 6 mice per group).

lymphoma cells. We found, in this study, that the transit time for the bulk of lymphocytes entering and departing the serous lymphoid tissues is between 6 and 48 h, with a delayed departure from the omentum compared with the mesentery within this period.

Structurally distinguishable types of serous lymphoid organoids with different lymphoma-binding characteristics

To characterize the mesenteric lymphocyte–binding regions, we next removed the whole gut–omentum–mesentery complex and stained it with hematoxylin, combined with lymphoma tracing. We found leaf-like formations, connected to the mesenteric adipose tissue either directly or via a slender stalk (Fig. 3A, 3B), both types showing robust uptake of Bc.DLFL1 cells (Fig. 3C). In addition, similar formations were also observed in the membrane lining of the omental bursa, appearing in paired or, less frequently, in single arrangement (Fig. 3D–F). Owing to their particular appearance, we denote these formations as FLAgs. Their dimensions were in the range of 250–450-µm length from base to tip, 150–250-µm width, and 30–80-µm thickness, respectively. The most typical location for FLAgs were the omental bursa, but in the omentum and in the mesenteric fat streaks, ~5–15% of lymphoma-binding foci also comprised adipose-associated FLAgs in young adult mice (6–10 wk of age). Furthermore, several distinct leukocyte-rich FALCs and crescent-shaped protrusions (Fig. 3B), both capable of DLBCL binding (Fig. 3C), were also present in both the omentum and mesentery, in addition to the FLAgs.

To compare the lymphoma-binding efficiencies of the FLAgs with FALCs and protrusions, next, we performed a quantitative measurement using XenoLight DiR fluorescence. Hematoxylin staining revealed that FLAgs and protrusions represent more condensed leukocyte clustering compared with FALCs and omental MS located on the adipose surface with less-defined boundaries. Moreover, protrusions connect with broader attachment area to the underlying adipose base and lack identifiable stalks, thus allowing

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

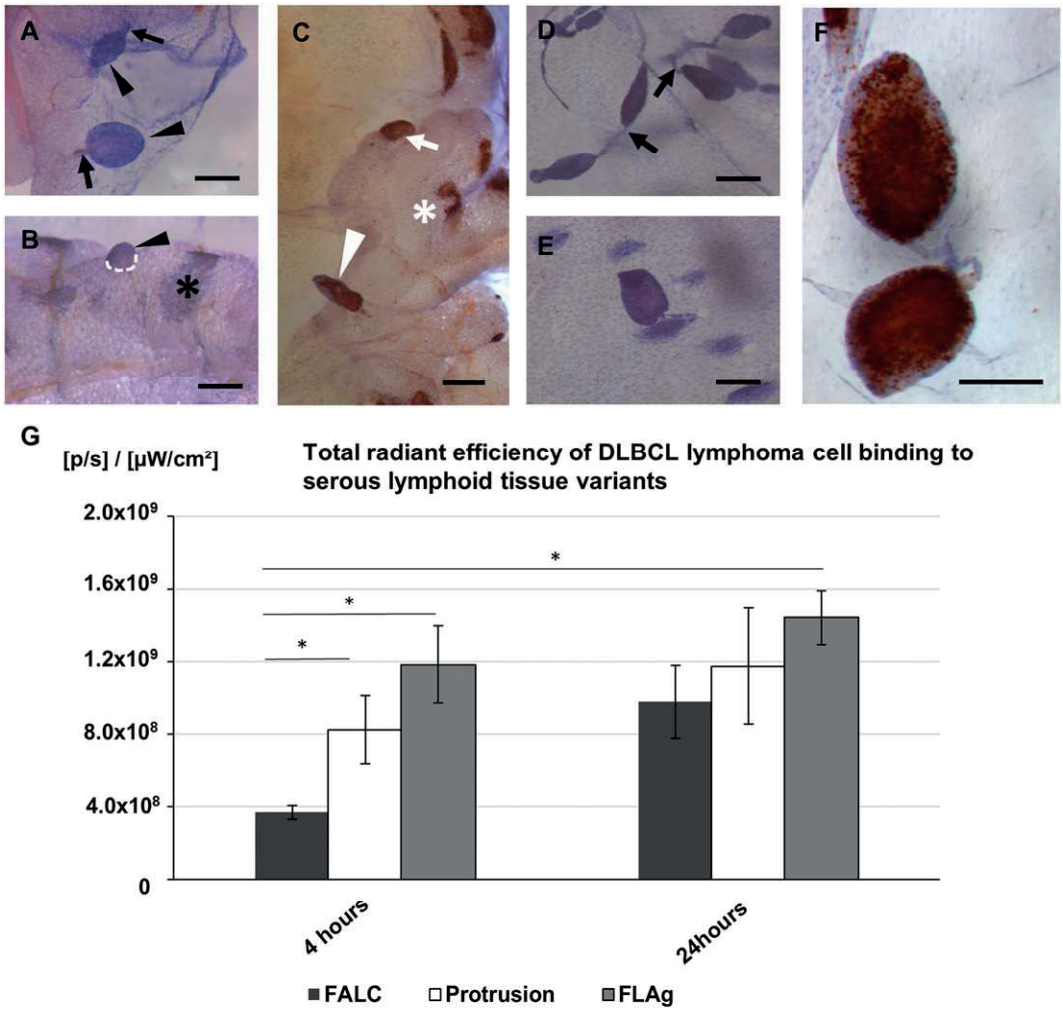


FIGURE 3. Appearance of lymphoma-binding serous lymphoid organoids. (**A**) Hematoxylin-stained single FLAgs (arrowhead) connected to mesenteric fat via slender stalks (labeled with arrows). (**B**) Omental lymphoid formations also include crescent-shaped protrusion (labeled with arrowhead) and diffuse MS (labeled with "*"; hematoxylin stain). Note the extended perimeter of the base (dotted line) of a typical protrusion connecting to the adipose tissue and the absence of stalk. (**C**) CFSE-labeled Bc.DLFL1 cells attach to mesenteric FLAgs (arrowhead), FALCs (*) and protrusion (arrow), visualized by brown anti-FITC–PO staining. (**D**) In the bursal membrane, the FLAgs typically occur in paired arrangement attached to the two sides of the peritoneum through slender stalks (indicated with arrows). (**E**) A solitary FLAg attached to the bursal peritoneum. (**F**) Bursal FLAgs efficiently bind CFSE-labeled Bc.DLFL1 cells 4 h after i.p. injection (anti-FITC–PO staining, brown). Scale bars, 200 µm. (**G**) Quantitation of XenoLight DiR–labeled Bc.DLFL1 lymphoma binding to serous lymphoid tissue types, as indicated by total radiant efficiency ($n = 6$ mice per group). *$p < 0.05$.

the microdissection of these different omental and mesenteric adipose lymphoid tissues after i.p. injection of XenoLight DiR–labeled Bc.DLFL1 cells. We observed the highest fluorescence signal in FLAgs (and with FALCs generating the lowest signal) at both the 4- and 24-h time points. In contrast, FALCs showed a marked increase of lymphoma binding by 24 h, whereas in FLAgs, the increase was less pronounced (Fig. 3G).

To determine whether these FLAgs occur only in BALB/c mice as a strain-specific trait, we also inspected C57BL/6J mice as a standard mouse strain used in immunological studies. We found in our C57BL/6J specific pathogen-free colony a similar occurrence of FLAgs in mice older than 8–10 wk. Their number is variable, usually in the range of 10–30 per mouse, with approximately twice as many sharply demarcated protrusions, and ~50–80 FALCs/MS together in the omenta and mesentery, although latter structures are sometimes difficult to evaluate as one or more confluent clusters using hematoxylin staining (data not shown).

Peritoneal lavage is a regular procedure to obtain murine PEC for the analysis of the leukocyte composition and characteristics of this compartment. To investigate whether lavage affects the presence of FLAgs, we compared their appearance and frequency after hematoxylin staining but found no difference to untreated controls, indicating that during PEC collection the detachment of cells from FLAgs is minimal if any (data not shown).

Subsequent electron microscopic analysis using semithin sections revealed that the FLAg structures are enveloped in a mesothelial layer. Underneath this capsule, the cortical area is richly perfused with capillaries, whereas the medullary region is enriched for lymphocytes (Fig. 4A–C). The serous surface of mesothelial cells covering FLAgs display several microvilli, whereas in the deeper regions, CD138-positive plasma cells can be frequently observed intermingled with reticular cells, often in paired arrangements, comprising around 2.5–6.5% of leukocytes (35–55 cells stained positive for CD138 from a midlevel focus plane of FLAgs containing 850–1250 cells) (Fig. 4D–F).

According to these findings, the murine visceral serous surface contains preformed leukocyte-rich areas with different appearances that can bind DLBCL cells. Among these structures, the FLAgs represent a uniquely shaped variant present in

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

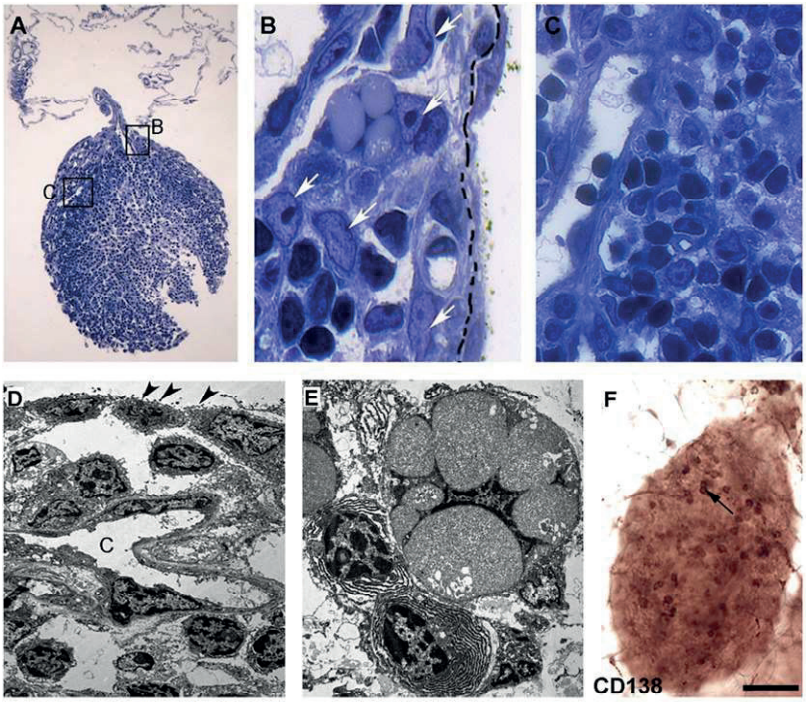


FIGURE 4. Ultrastructure of FLAgs. (**A**) One-micron-thick longitudinal section of a FLAg with the stalk attachment to the peritoneal membrane, stained with toluidine blue. (**B** and **C**) High-power magnification views of the boxes marked in figure (A). (B) The surface of the FLAg is covered by mesothelial cells (dashed line). Reticular cells [arrows in (B)] and lymphocytes [in (C)] fill the FLAg body. (**D**) Electron micrograph of the FLAg's central part showing mesothelial cells with microvilli (arrowheads), one capillary (C), and the extravascular region populated by lymphocytes. (**E**) High-magnification electron micrograph showing two adjacent plasma cells containing extensive endoplasmic reticulum. (**F**) Representative image of anti-CD138 whole-mount immunohistochemistry of FLAgs shows single or paired (arrow) plasma cells (n = 6). Scale bar, 100 μm.

both membrane-attached and adipose-associated locations, and these formations collect most efficiently the lymphoma cells injected i.p.

Lymphoid architecture and homeostatic chemokine domains of FLAgs affecting the segregation of lymphocytes and DLBCL subtypes

The striking form of FLAgs clearly distinguishable from the more diffuse forms of serous leukocyte clusters (such as MS or FALCs) prompted us to investigate their lymphoid subset composition using whole-mount immunohistochemistry. To verify their leukocyte content, we first used anti-CD45 labeling, resulting in a robust reactivity throughout the FLAgs, compared with the slightly less–dense labeling of the FALCs on the serous surface of adipose cuffs (Fig. 5A). Anti–Thy-1/CD90 labeling demonstrated a concentrated accumulation of T cells within the medullary region of FLAgs, whereas the anti-B220 labeling revealed a more diffuse B cell distribution (Fig. 5B, 5C). The marginal area of the FLAgs contained a dense network of LYVE-1–positive cells (Fig. 5D), previously described as FALC/MS-associated macrophages (10). Using dual immunofluorescence for Thy-1 and IgM, followed by confocal microscopy, we confirmed that Thy-1–positive T cells accumulated separately from the IgM-positive B cells, latter typically located at the peripheral regions toward the stalk connection and the tip regions as well as on the surface (Fig. 5E).

The partially segregated pattern of T and B cells suggested the presence of homeostatic chemokines recruiting specific lymphocyte subsets to separate domains within FLAgs. Labeling for Thy-1, B220, and either CCL21 or CXCL13 revealed discrete regions with different chemokine production. Thus, CCL21 production was confined to the central region of the FLAgs coupled with T cell clustering, whereas CXCL13 expression appeared more widespread (Fig. 5F, 5G). These findings suggest that within FLAgs a central region with T cell enrichment is partially separate from the peripheral B cell rich regions, parallel to corresponding homeostatic chemokine dominance.

To test whether the central CCL21-positive domain and the peripheral CXCL13-producing region can also affect the positioning of B cell lymphoma cells with different lymphoid compartment derivation, we compared the distribution of Bc.DLFL1 as extrafollicular DLBCL and A20 as centroblastic DLBCL (24), respectively. Cell surface phenotyping for B cell–associated markers revealed that whereas both Bc.DLFL1 and A20 cells demonstrated similar levels of surface CD19, in Bc.DLFL1 cells, the expression of CD21 and CD23 were reduced, whereas MAC-1/CD11b/CD18 expression was increased compared with A20 cells (Fig. 6A). Importantly, A20 cells display CXCR5 and lack CCR7, whereas Bc.DLFL1 cells have the opposite chemokine receptor pattern (Fig. 6B). Spectral karyotyping analysis (performed at the Molecular Cytogenetics Facility MD Anderson Center, Houston, TX) also revealed a different karyotype for Bc.DLFL1 cell, including 39–41 XX with t(6:10); t(10:6); t(10:11), in contrast to 39×/−, t (2, 15), del (6), del (9), dup (14) reported for A20 (24). Thus, these two DLBCL lines represent genetically and phenotypically two distinct lymphoma variants.

We found that 2 h after i.p. injection of mixed lymphoma cells, A20 cells accumulate at the cortical rim of the FLAgs, whereas Bc.DLFL1 cells readily enter the central region of the FLAg body where, under normal circumstances, T cells congregate. Interestingly, within the omental or mesentery-associated flat FALCs, such segregation did not occur, the A20 and Bc.DLFL1 cells remained mixed (Fig. 6C, 6D). To exclude that the differential migration within FLAgs was due to a competition between two different cell types being simultaneously present, we repeated this experiment using $A20^{Lacz}$ cells alone. We found that, at the same time point, $A20^{Lacz}$ cells remained excluded from the center of the FLAgs and accumulated in the cortical rim, whereas in FALCs, they were diffusely distributed (Fig. 6E, 6F), thus their exclusion from the FLAg center was not due to the presence of competing cells.

These data establish that, within FLAgs, different chemokine domains exist that segregate T and B cells and can also influence the specific accumulation of DLBCL subtypes as defined by their chemokine receptor display, whereas in FALCs, such lymphoma segregation is absent.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

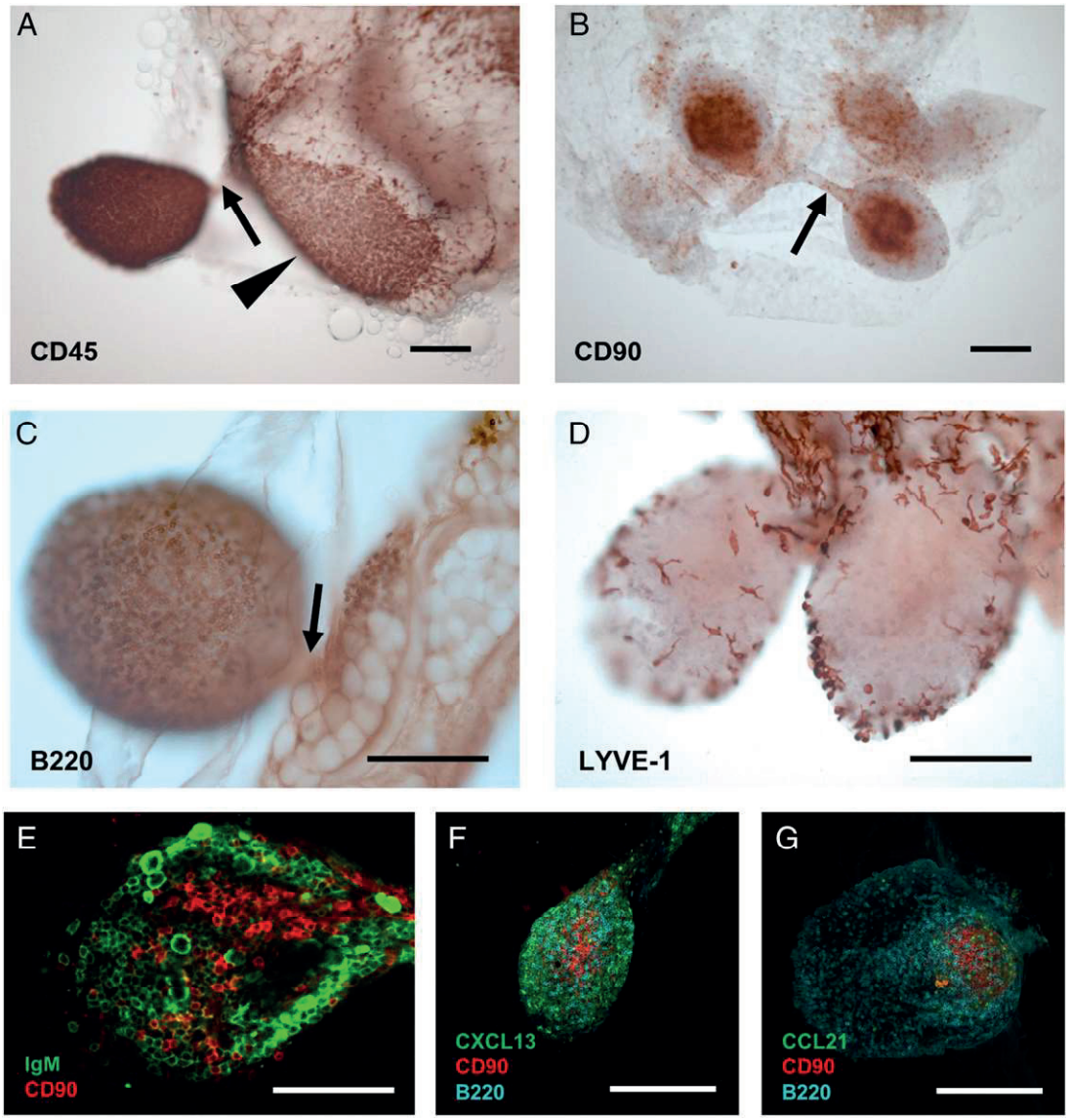


FIGURE 5. Lymphoid organization and homeostatic chemokine domains of FLAgs. Omental (**A**), membrane-bound (**B**), and mesentery-associated variants (**C** and **D**) were labeled for the markers as indicated using indirect immunohistochemistry and DAB reaction (brown) of whole-mount samples. Arrows in (A)–(C) mark stalk, arrowhead in (A) points to a FALC/MS. (**E**) Partial T/B compartmentalization revealed with anti-IgM (green) and anti-CD90/Thy-1 (red) dual immunofluorescence by confocal microscopy (2.5-μm optical section thickness). (**F**) B cell chemoattractant CXCL13 (green) is expanded in the peripheral segment enriched for B cells (turquoise) with a relative paucity in the region with T cell clustering (red). (**G**) Focal accumulation of CCL21 (green) adjacent to T cell clustering (red) and its absence in the B cell populated region in membrane-associated FLAg. Scale bars, 200 μm (representative figure, $n = 5$ mice per group, repeated twice).

Stromal organization and vascular layout of FLAgs

The presence of capillaries and reticular cells in FLAgs suggested the prolonged persistence of these lymphoid formations, raising the question of organization of their nonhematopoietic constituents. We first tested if FLAgs contain Fn as major ECM component. We found that FLAgs in both membrane- and adipose-associated locations contain an extensive Fn meshwork throughout the FLAg body, extending into the stalk regions (Fig. 7A). Using VCAM-1 as a broadly expressed stromal marker expressed in peripheral lymphoid organs, we found a pronounced capillary labeling along the FLAgs stalk, as well as cells with reticular fibroblastic appearance (Fig. 7B).

Using anti-CD31 immunohistochemistry, we found that both the stalk and body parts of FLAgs contain an elaborate meshwork of CD31-positive blood capillaries. Furthermore, within the stalk-proximal parts of both omental and mesentery-associated FLAgs, short PNAd-positive vascular segments could be detected (Fig. 7C). Using anti–MAdCAM-1, CR1/2, and anti-ICAM immunohistochemistry, the FLAgs did not display any discernible follicular stromal reactivity suggesting follicular dendritic cells or mucosal-type HEVs (data not shown).

We also sought to identify lymphatic capillaries staining for hyaluronan receptor LYVE-1 (25) or the expression of lymphatic endothelial cell (LEC)–specific transcription factor Prox-1 (26). We found that FLAgs contained only a few scattered cells expressing GFP in Prox-1 reporter mice (Fig. 7D). Furthermore, whereas macrophages with intense LYVE-1 labeling were present in a discontinuous arrangement at the FLAg edges, as described for omental FALCs and MS (10), they showed no vascular organization, supporting the lack of lymphatics (Fig. 7E, 7F).

These findings reveal that the nonhematopoietic structure of FLAgs includes VCAM-1–positive stromal cells embedded in a

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

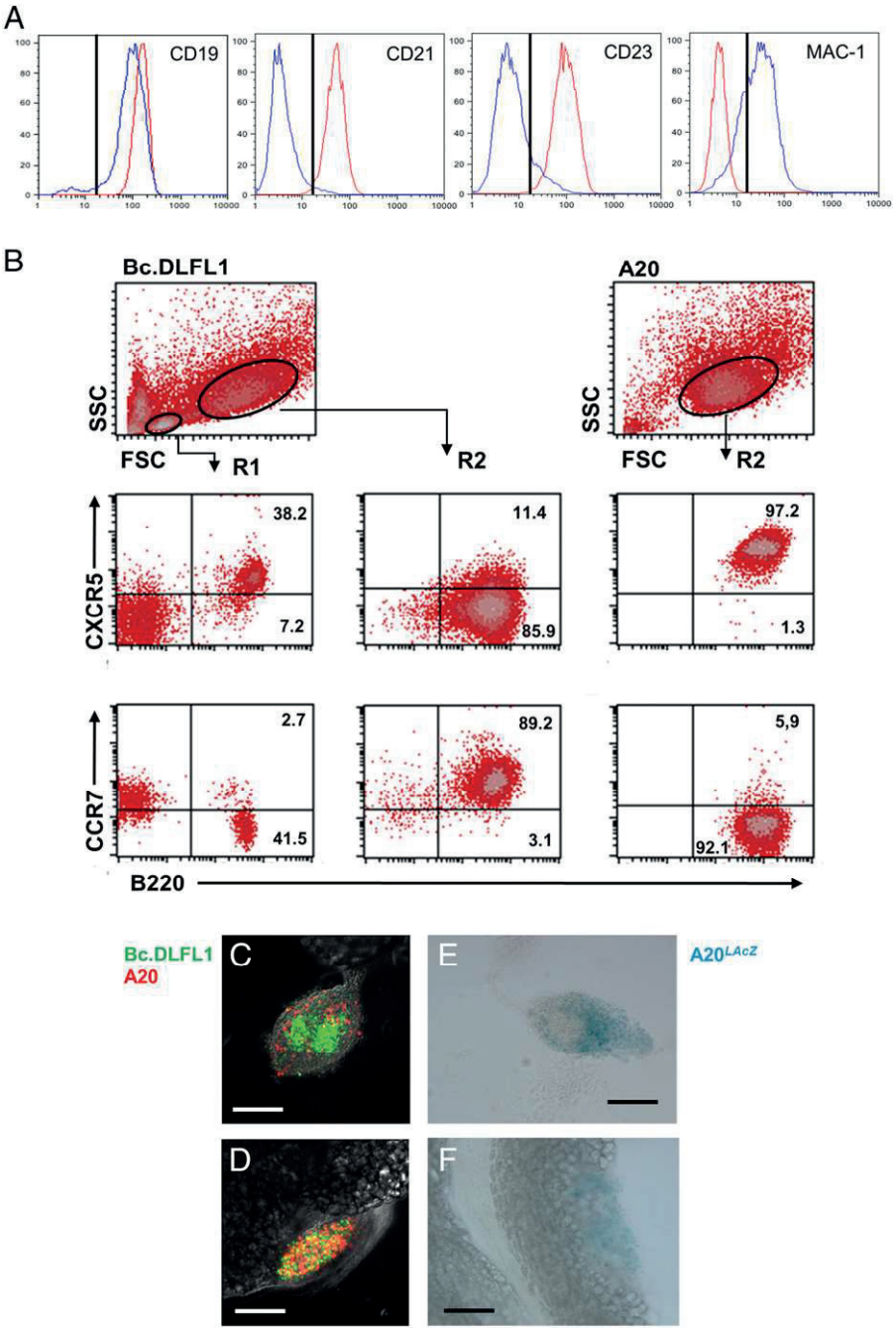


FIGURE 6. Surface characteristics and in vivo segregation of Bc.DLFL1 and A20 DLBCL cells in serous lymphoid tissues correlated with their chemokine receptor expression and tissue variant. (**A**) Different surface phenotype of Bc.DLFL1 (blue) and A20 (red) lymphoma cells in histogram overlays (markers indicated at the top, vertical line indicates the cutoff for control labeling). (**B**) Differential expression of chemokine receptors CXCR5 and CCR7 in Bc.DLFL1 and A20 cells in comparison with normal B cells (gated on live B220-positive lymphocytes [R1] or blast [R2] cells as defined by FSC/SSC). Representative sample of an experiment repeated twice. (**C**) Segregation of CFSE-labeled Bc.DLFL1 cells (green) and CTFR-labeled A20 cells (red) 2 h after injection segregate in FLAg. (**D**) In diffuse FALCs, the two lymphoma variants remain mixed (using differential interference contrast [DIC] image background). (**E**) Without competitor cells, $A20^{Lacz}$ cells (detected by X-gal staining, blue) are also excluded from the central region and accumulate in the periphery of the FLAg but are scattered throughout the FALC (**F**). Scale bars, 100 μm (representative figures, $n = 6$ mice per group, repeated twice).

Fn-rich ECM, and FLAgs are supplied by blood capillaries containing short PNAd-positive segments, but FLAgs lack a defined LEC vasculature.

Peritoneal spreading of DLBCL involves LYVE-1–positive macrophages, followed by propagation through mesenteric lymphatic capillaries

To chart the lymphoma-binding and dissemination routes following i.p. injection involving FLAgs, next, we used various labeling strategies. First, we investigated whether Bc.DLFL1 cells bind to the LYVE-1–positive macrophages. Using CFSE-labeled lymphoma cells and combined immunofluorescence for LYVE-1 and Fn as FLAg ECM compound, we found that 1 h after injection, CFSE-labeled lymphocyte accumulate at the tip part of the FLAgs enriched for LYVE-1–positive macrophages, whereas a small fraction had already entered the FLAg body. Interestingly, both migrating lymphoma cells and LYVE-1–positive macrophages could be observed in a close association with Fn bundles (Fig. 8A).

To confirm that it is indeed macrophages that mediate the early binding of lymphoma cells, next, we studied how their depletion by the i.p. administration of clodronate liposomes (27) affects lymphoma homing. We found that a 24-h-long pretreatment with clodronate liposome led to an ~80% reduction in the subsequent mesenteric and omental binding of XenoLight DiR–labeled Bc.DLFL1 cells after a 4 h period (Fig. 8B, 8C) together with the substantial loss of LYVE-1–positive macrophages from the peritoneal membrane and FLAgs (Fig. 8D–F) compared with PBS-liposome control treatment, indicating effective removal of macrophages that, in turn, led to the significant reduction of serous lymphoma adhesion.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

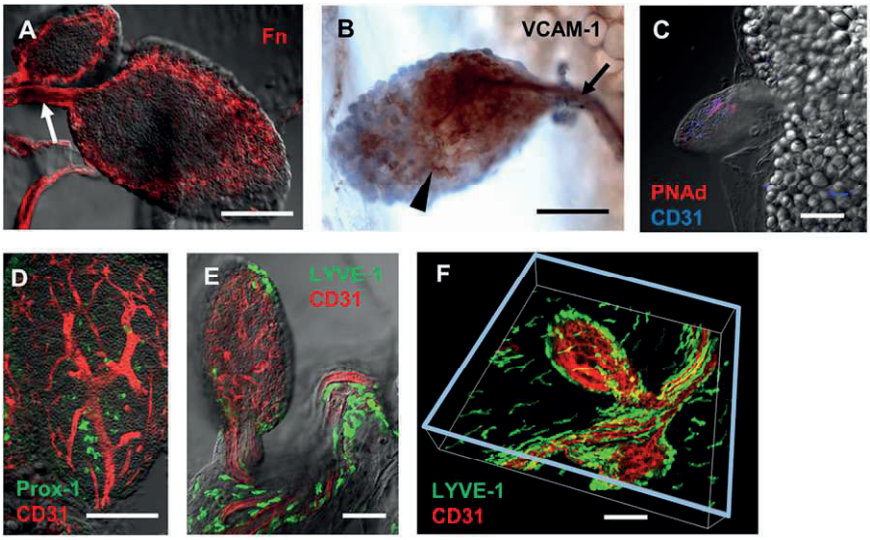


FIGURE 7. Stromal organization and patterning of FLAgs. (**A**) Peritoneal membrane-bound FLAg labeled for Fn reveals a dense Fn meshwork throughout the FLAg body, extending into the FLAg stalk (indicated with an arrow) with differential interference contrast (DIC) image background. (**B**) Anti–VCAM-1 immunohistochemistry (brown/DAB staining) of a mesentery-associated FLAg shows one capillary within the stalk (arrow) and several reticular cells with branched appearance in the FLAg body (arrowhead). (**C**) Within the extensive capillary meshwork in mesentery-associated FLAgs stained for CD31 (blue), short PNAd-positive segments (purple) are present. (**D**) Dispersed cells with Prox-1/GFP (green) expression correlated with CD31 (red) endothelial staining indicates the absence of defined lymphatic capillaries. (**E**) LYVE-1 staining (green) in combination with CD31 (red) labeling also demonstrates the lack of LECs, with strongly LYVE-1–positive cells displaying macrophage features. (**F**) Three-dimensional (3D) reconstitution of Z-stacks containing rich CD31-positive (red) capillary meshwork, with LYVE-1–positive macrophages (green) enriched at the edge of FLAgs, also present as individually dispersed cells in the peritoneal membrane. Scale bars 50 μm. (representative figures, n = 6 mice per group, repeated twice).

As the progress of Bc.DLFL1 lymphoma involves spreading into the mLNs, next, we studied whether injected lymphoma cells can be located within the mesenteric lymphatic capillaries. Using CFSE-labeled lymphocytes and anti-FITC whole-mount immunohistochemistry, first, we found thin-walled capillaries within the adipose streaks of mesentery in a close vicinity of original lymphoma attachment at 24 h after the injection, suggestive of lymphatic vessels (Fig. 8G). To verify the entry of lymphoma cells into lymphatic capillaries, we used (*Prox1*-GFP crossed with BALB/c) F1 backcross mice as lymphoma recipients expressing GFP in LECs (18); thus, the positioning of CTFR (red) fluorescence labeled lymphoma cells within capillaries formed by GFP-marked LECs could be analyzed by confocal microscopy without immunological rejection. We found that, as early as 4 h postinjection, CTFR lymphoma cells enter the GFP-positive lymphatic capillaries (Fig. 8H, 8I) in the mesentery.

According to our findings, the initial event for the serous propagation of DLBC lymphoma cells is their attachment to LYVE-1–positive macrophages in FLAgs and less efficiently in FALCs. Next, the lymphoma cells migrate toward the lymphatic capillaries within the mesentery, where the lymphoma cells can enter the draining capillaries, thus gaining access to the mLNs for subsequent expansion. Moreover, as the FLAgs (although they efficiently bind B cells and DLBCL cells) are devoid of demonstrable lymphatic capillaries, the entry sites of i.p. injected lymphoma cells into the mesenteric lymphatic drainage are located outside the FLAgs.

Vascular entry of lymphocytes to serous lymphoid tissues is partly L-selectin dependent

The presence of PNAd-positive segments in both mesenteric and omental FLAgs and FALCs raised the possibility of their involvement in the local leukocyte extravasation mediated by PNAd ligand L-selectin, similar to pLNs. To determine whether the blockade of L-selectin abrogates the serous extravasation of lymphocytes from blood vessels, we performed a competitive adoptive cell transfer experiment using KikGR detection (19). In this study, KikG cells pretreated with saturating amount of anti–L-selectin mAb MEL-14 were coinjected i.v. with untreated KikR cells (with the Kik fluoroprotein switched to red variant upon photoconversion of pLNs from KikG mice), and their relative appearance in the omentum and mesentery was determined by flow cytometer following CD45 labeling (Fig. 9A). We found that, 1 h after the injection, a substantial blockade occurred in the pLNs, whereas no measurable alteration of the original KikG/KikR ratio was observed in the spleen with L-selectin–independent homing. In the mesentery, a partial blockade could be observed, at around 50% less inhibition of homing compared with pLN (Fig. 9B). In the omentum, we detected only very sparse Kik donor cell appearance in this period, hampering the precise determination of the degree of inhibition (data not shown).

Next, we compared the expression of mRNA for the core proteins and glycosylation enzymes necessary for the production of MECA-79 epitope of PNAd. Although the FLAgs are more abundant in the mesentery in variable distribution, we chose omenta as sample, owing to their more uniform tissue size and composition, including the presence of FLAgs. With quantitative PCR of omental samples, we found that *Cd34*, endomucin (*Emcn*) and podocalyxin (*Podxl*) core proteins mRNA and β1-6GlcNAc transferase (*Cgnt2*) enzyme mRNA levels variably increased, whereas GLYCAM (*Glycam1*) core protein, intercellular cell adhesion molecule/ICAM (*Icam*) as well as *Cgnt1*, β-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (*B3gnt3*) and fucosyltransferase (*Fut7*) enzyme mRNA increased to different degrees in comparison with pLN reference of target gene/β-actin mRNA ratios (Fig. 9C, 9D).

These data indicate that the extravasation of blood-borne lymphocytes to serous lymphoid tissues partially depends on the interaction between L-selectin and MECA-79–positive PNAd endothelial ligands, generated by the concerted action of several core proteins and modifying enzymes with detectable level of

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

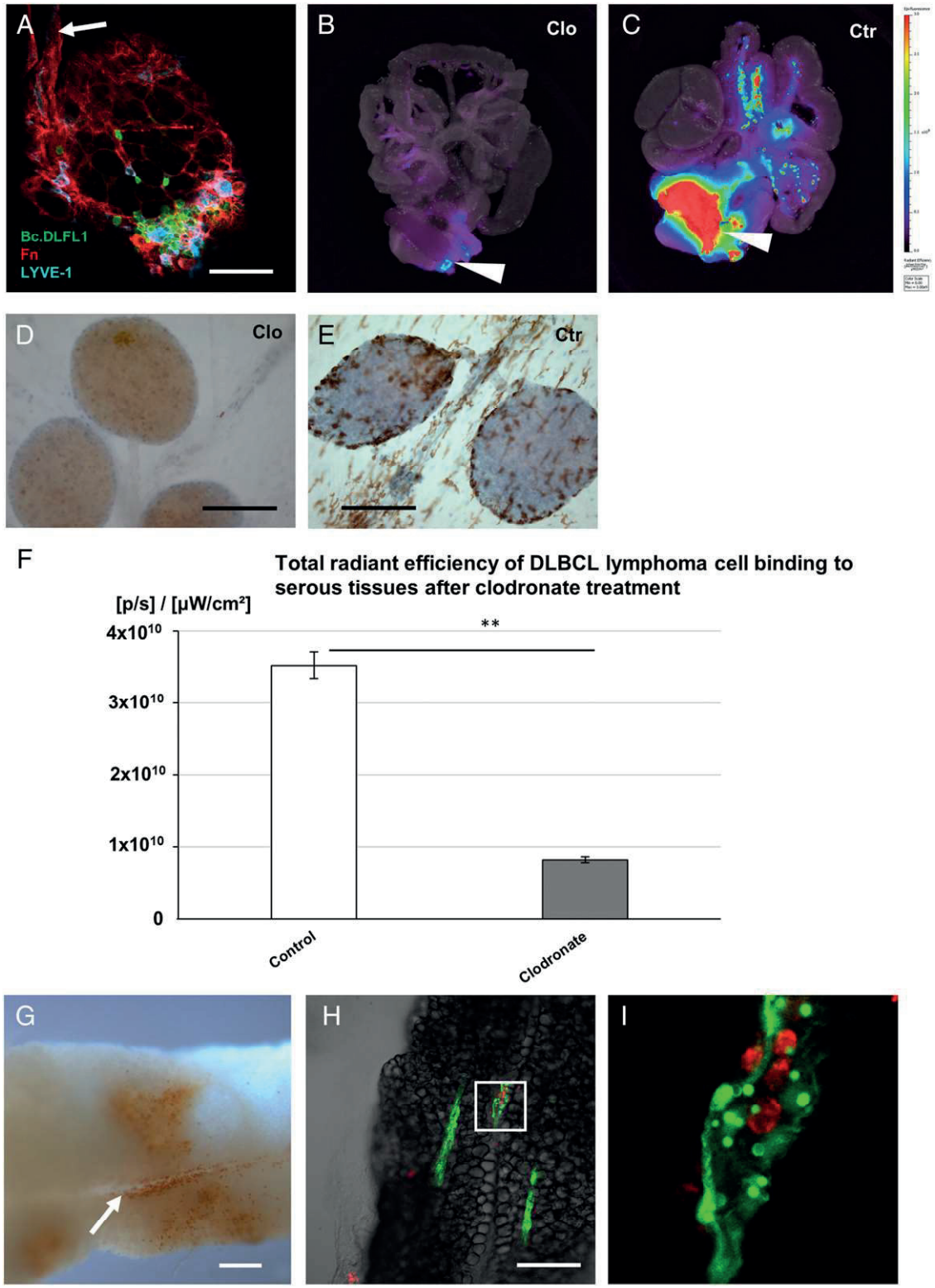


FIGURE 8. DLBCL binding to LYVE-1–positive macrophages and entry into *Prox1*-positive lymphatic vessels. (**A**) Initial binding of CFSE-labeled Bc.DLFL1 cells (green) to LYVE-1–positive (blue) macrophages at the tip of membrane-associated FLAg (outlined by Fn-staining, red; median plane, 2.5-μm optical thickness) 2 h after i.p. injection of lymphoma cells; arrow indicates a stalk. (**B**) Pretreatment with clodronate liposome effectively reduces adherence of XenoLight Dir–labeled lymphoma cells to serous lymphoid organoids compared with PBS-liposome pretreatment (**C**) [arrowheads in (B) and (C) point to omental signal source]. (**D**) Administration of clodronate liposome treatment eliminates LYVE-1–positive macrophages compared with PBS–liposome control (**E**) (samples stained with anti–LYVE-1 immunohistochemistry using H_2O_2/DAB [brown] development 24 h after liposome treatment). Scale bars, 200 μm. (**F**) Quantitation of the reduction of serous binding of XenoLight DiR–labeled Bc.DLFL1 lymphoma in clodronate liposome-treated mice as indicated by total radiant efficiency (average ± SD; $n = 3$ mice per group). $^{**}p < 0.01$. (**G**) Congregation of CFSE-labeled lymphoma cells (detected with anti-FITC–HRP, brown) around and within a thin-walled mesenteric lymphatic vessel (arrow). Scale bar, 1 mm. (**H**) Using dual fluorescence CTFR-labeled cells (red) are positioned within or adjacent to these structures expressing *Prox1*^{GFP}. Scale bars, 200 μm. (**I**) A higher magnification of the region outlined with a rectangle in (H) is demonstrated. Representative image from a cohort of three mice.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

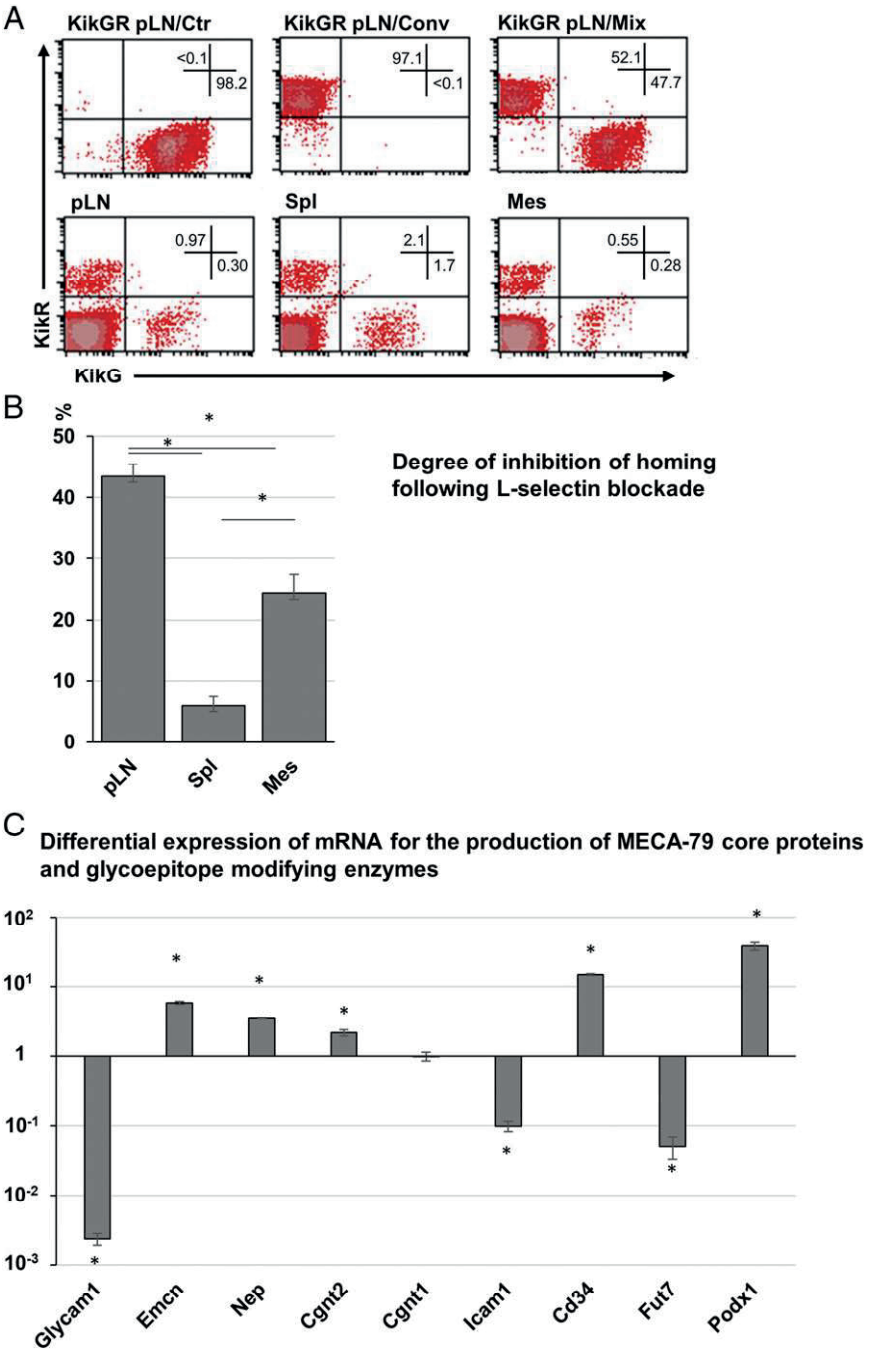


FIGURE 9. Partial L-selectin dependence of serous homing and mRNA profile of omental PNAd production. (**A**) Flow cytometric identification of lymphocytes from unconverted KikG (top left) and converted KikR (top middle) lymph nodes and their mixture (top right) gated on FSC/SSC/CD45, with the frequency of cells in the corresponding quadrants indicated in the upper-right quadrant of the density plots, with the KikG/KikR parameters indicated at the horizontal and vertical axes. In the bottom row, the KikG/KikR distribution is shown in pLNs, spleen (Spl), and mesentery (Mes) from mice injected with a mixture of anti–L-selectin, mAb-treated KikG and untreated KikR lymphocytes (representative figures from a group of three mice). (**B**) Quantitation of the degree of inhibition of tissue homing of KikG lymphocytes by MEL-14 mAb 2 h after the injection of KikG/KikR lymphocyte mixture (n = 3 mice per group). (**C**) Comparison of core protein and glycosylation enzyme mRNA involved in the production of MECA-79 in the omentum and lymph nodes by quantitative PCR (qPCR). The ratios of target gene/β-actin mRNA ratio are depicted, in which the pLN value is indicated as 1 (average ± SEM, n = 3 mice/group). *$p < 0.05$.

mRNA production, probably via the simultaneous involvement of different serous lymphoid organoids.

Discussion

In our present work, we establish that, following i.p. injection, normal B cells and DLBCL cells readily colonize various serous lymphoid organoids in the abdominal cavity whence, despite the lack of lymphatic vessels, they gain access to the mesenteric lymphatic capillaries. These capillaries, in turn, thus represent a dual afferentation route for the mLNs, draining both the gut and the peritoneal cavity. As early serous docking sites, morphologically different lymphoid formations may be seeded by lymphoma cells (6) and normal B cells, including a hitherto undescribed structure denoted as FLAg in a process involving LYVE-1–positive peritoneal macrophages. FLAgs show a partial T/B compartmentalization and the presence of domains producing CXCL13 and CCL21 homeostatic chemokines. Furthermore, in contrast with the previously described diffuse MS and FALC structures (1, 2), FLAgs are completely enveloped into mesothelial cells, suggesting a hitherto unknown type or stage of adipose-associated peripheral lymphoid tissues.

The degree of compartmentalization of the bulk of omental lymphoid tissues into T and B cell zones is substantially less than that of the mucosal draining sites, such as mLNs or Peyer's patches (1, 2, 10). However, in FLAgs, a concentrated T-zone can typically be identified, corresponding to the region producing CCL21, whereas the peripheral region of FLAgs is enriched for CXCL13 production, which is necessary for omental B cell entry (7, 10). In the omentum, CXCL13 production has been attributed to both hematopoietic cells and, to a lesser extent, nonhematopoietic stromal cells (8, 10). In FLAgs, the relative enrichment of VCAM-1–positive stromal cell in the center suggests possible

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

dc_1678_19

involvement in CCL21 production, whereas the more prominent production of CXCL13 in the periphery can be linked to LYVE-1–positive macrophages (10), in addition to VCAM-1 being a possible key vascular adhesion molecule for omental homing of recirculating B cells (11). Whether follicular dendritic cells as cardinal CXCL13-producing stromal cells in secondary lymphoid tissues are also present in FLAgs requires further investigations, including phenotypic analysis and functional assays, particularly germinal center formation and long-term immune complex retention. Although the treatment of EL4 T cell lymphoma cells with pertussis toxin did not affect their accumulation in omental foci (7), T and B cells and various DLBCL variants within FLAgs show evidences for partial segregation, indicating that the various forms (MS and FALCs) of serous lymphoid aggregates have different levels of chemokine-mediated organization affecting T/B positioning. It is not yet known whether B-1 B cells within the B cell–rich areas accumulate to separate regions relative to the B-2 subset. Thus, for determining the significance of pertussis toxin–sensitive chemokine signaling in the subsequent omental or mesenteric migration of B cells and DLBCL cells within different types of serous lymphoid tissues, further investigations are needed.

Importantly, previous studies demonstrated that the surgical removal of omentum did not prevent the departure of peritoneal B cells, hinting at other potential exit sites (11), with mesenteric FALCs and FLAgs offering possible candidates as demonstrated in our present work. Our findings indicate mesenteric lymphoid organoids (including FALCs and FLAgs) as alternative lymphocyte-binding sites for subsequent exit routes, at an efficiency of lymphoma binding nearly equal to omental MS lymphoma adhesion. Among various formations, we observed different lymphoma-binding kinetics, indicating faster homing to FLAgs compared with FALCs, which may mediate both more efficient adherence and faster exchange kinetics, as the FLAg-bound lymphoma cell load did not change significantly over a 24-h period.

In contrast to the abundance of blood vasculature, in the omentum, we found only occasional LEC-marker expression, unlike in the mesentery, where typically several confluent lymphatic vessels displaying Prox-1 and LYVE-1 are present. Moreover, relying on these markers, we failed to detect lymphatic connection between the FALCs or FLAgs as mesenteric lymphoma-docking sites and the deep-running lymphatic vessels. Therefore, we can rule out direct lymphatic communication connecting either FLAgs or FALCs and mesenteric lymphatics, clearly necessitating further investigations to clarify the movement of FLAg/FALC-attached lymphocytes and lymphoma cells toward the mesenteric lymphatic vessels. Nevertheless, our kinetic analyses suggest that relatively early (4 h) after the i.p. injection, DLBCL cells are already detectable within the mesenteric lymphatic capillaries. Furthermore, the kinetics of normal B cell distribution following i.p. injection also suggests a faster departure from the mesentery than from the omentum after 24 h, possibly because of the drainage via the mesenteric lymphatic vessels, which appear absent in the omentum. Moreover, similar early accumulation of both normal B cells and DLBCL cells in human tumors with disrupted Gα13 (thus compromising S1P-mediated inhibition of migration induced by CXCL12) was also noted in the parathymic lymph nodes, where lymphocytes could reach this site either across the lymphatic stomata of the diaphragma or via lymphatic vessels (11, 28). In addition, radiodiagnostic imaging of human patients has also revealed the propagation of Burkitt lymphoma and DLBCL via the gastrocolic, gastrosplenic, and other peritoneal ligaments toward the mesocolon (29). Subsequent inflammatory reactions may expand the preexisting lymphatic vasculature by LEC proliferation upon the effect of VEGF-C produced by perivascular smooth muscle cells and macrophages or by the direct integration of LEC-switched macrophages (30).

The capacity of lymphoma cells to adhere to such serous lymphoid formations along the mesentery represents a significantly expanded spectrum of potential propagation sites for this type of malignancies in addition to the omental MS also targeted by gastric, colonic, and ovary cancer cells (6, 31, 32). As both mesenteric FALCs and omental MS are able to host local immune responses, the entry of tumor cells into these lymphoid territories may elicit an immune reaction against such cells (1, 2, 6). However, the adipose microenvironment also offers a supportive milieu for cancers, thus antagonizing the efficiency of antitumor immune responses (31, 33, 34), in which cytotoxic reactions can also be modulated by ILC2 and myeloid-derived suppressor cells (8, 35). This tumor growth–promoting function may manifest in several ways, including the niche function of local microenvironment to support cancer stem cell growth. Alternatively, these sites may attract putative tumor–associated stroma precursors, including myofibroblast precursors or mesenchymal stem cells that exert immunosuppressive activity (36, 37) as well as chemotactic signals, including CXCL12–CXCR4 and CCL22–CCR4 interactions (38, 39). In omental tissue, the local microvascular network of actively sprouting CD105-positive capillaries influenced by VEGF-A binding several tumor types (32) may facilitate both the entry for recirculating stroma precursors and exit for cancer cell dissemination. In addition, local mesothelium–mesenchymal transition may also promote the appearance of cancer-associated fibroblasts, whereas adipocytes may also contribute to vessel expansion following their dedifferentiation and endothelial redifferentiation (40, 41).

The i.v. entry of lymphocytes to the MS and their retention, and their peritoneal entry are likely to be mediated by different adhesion events, as the egress from the peritoneal cavity was independent from β7 integrin ligand binding (11). The detectable level of mRNA for various PNAd core proteins and modifying enzymes involved in the generation of MECA-79 epitope in selective segments of vasculature within the omenta and mesentery supports the view that the local formation of available endothelial ligand permits L-selectin–mediated homing of blood-borne leukocytes, similar to pLN HEVs. However, the precise comparison with pLN HEVs necessitates the isolation of FLAgs for the enrichment of MECA-79–positive endothelial cells. Furthermore, anti–L-selectin treatment could only partly inhibit the entry of blood-borne lymphocytes to serous lymphoid tissues, indicating other potential endothelial recognition mechanisms, also likely to be independent from MAdCAM-1 binding, as the FLAg-associated vascular segments lacked this addressin. Because of the small size and transparent appearance of FLAgs, our attempts to isolate them in unfixed and unstained conditions have remained unsuccessful. Nevertheless, the presence of PNAd-positive vessels as well as the efficient binding through LYVE-1–positive macrophages together (thus offering access for both blood-borne and serous leukocytes) may explain the increased lymphocyte density within FLAgs compared with omental or mesenteric FALCs. Further analyses are required to identify other endothelial ligand–receptor pairs that facilitate serous homing of recirculating leukocytes.

In summary, we propose that the serous lymphoid aggregates function as peritoneal collection sites for both normal B cells and DLBCL cells. These lymphoid clusters have diverse structural variants displaying different degrees of lymphocyte compartmentalization, with FLAgs demonstrating a more organized

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020

variant. From these sites, the peritoneal lymphocytes may subsequently reach the mesenteric lymphatic capillaries, which, in turn, thus represent shared transit routes for both leukocytes, leaving the mucosal and the serous compartments, whereas the dissemination of peritoneal leukocytes and lymphoma cells may involve also other routes, particularly toward the mediastinal cavity and pleural surface. As initial contact partner cells binding B cell and DLBCL, LYVE-1–positive macrophages may play crucial roles; however, the identity of chemotactic and other factors guiding the lymphocytes toward the mesenteric lymphatic capillaries remains to be determined.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Dr. Constance L. Cepko (Departments of Genetics and Ophthalmology, Howard Hughes Medical Institute, Harvard Medical School, Boston, MA) for the PA317 packaging cells producing replication-defective retroviral vectors containing the bacterial gene for β-galactosidase and Dr. Kyle R. Gee (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR) for providing CTFR dye. Spectral karyotyping was performed at the Department of Genetics, Division of Basic Science Research, The University of Texas MD Anderson Cancer Center (Houston, TX), headed by Dr. Asha S. Multani.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Meza-Perez, S., and T. D. Randall. 2017. Immunological functions of the omentum. *Trends Immunol.* 38: 526–536.
2. Cruz-Migoni, S., and J. Caamaño. 2016. Fat-associated lymphoid clusters in inflammation and immunity. *Front. Immunol.* 7: 612.
3. Jackson-Jones, L. H., and C. Bénézech. 2018. Control of innate-like B cell location for compartmentalised IgM production. *Curr. Opin. Immunol.* 50: 9–13.
4. Ha, S. A., M. Tsuji, K. Suzuki, B. Meek, N. Yasuda, T. Kaisho, and S. Fagarasan. 2006. Regulation of B1 cell migration by signals through toll-like receptors. *J. Exp. Med.* 203: 2541–2550.
5. Liebermann-Meffert, D. 2000. The greater omentum. Anatomy, embryology, and surgical applications. *Surg. Clin. North Am.* 80: 275–293, xii.
6. Liu, J., X. Geng, and Y. Li. 2016. Milky spots: omental functional units and hotbeds for peritoneal cancer metastasis. *Tumour Biol.* 37: 5715–5726.
7. Rangel-Moreno, J., J. E. Moyron-Quiroz, D. M. Carragher, K. Kusser, L. Hartson, A. Moquin, and T. D. Randall. 2009. Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. *Immunity* 30: 731–743.
8. Ansel, K. M., R. B. Harris, and J. G. Cyster. 2002. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity* 16: 67–76.
9. Moro, K., T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii, and S. Koyasu. 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463: 540–544.
10. 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, et al. 2015. Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. *Nat. Immunol.* 16: 819–828.
11. Berberich, S., S. Dähne, A. Schippers, T. Peters, W. Müller, E. Kremmer, R. Förster, and O. Pabst. 2008. Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots. *J. Immunol.* 180: 2196–2203.
12. Lábadi, A., and P. Balogh. 2009. Differential preferences in serosal homing and distribution of peritoneal B-cell subsets revealed by in situ CFSE labeling. *Int. Immunol.* 21: 1047–1056.
13. Kasagi, Y., Y. Harada, Y. Morodomi, T. Iwai, S. Saito, K. Yoshida, E. Oki, H. Saeki, K. Ohgaki, M. Sugiyama, et al. 2016. Peritoneal dissemination requires an Sp1-dependent CXCR4/CXCL12 signaling axis and extracellular matrix-directed spheroid formation. *Cancer Res.* 76: 347–357.
14. Karaosmanoglu, D., M. Karcaaltincaba, B. Oguz, D. Akata, M. Ozmen, and O. Akhan. 2009. CT findings of lymphoma with peritoneal, omental and mesenteric involvement: peritoneal lymphomatosis. *Eur. J. Radiol.* 71: 313–317.
15. Cabral, F. C., K. M. Krajewski, K. W. Kim, N. H. Ramaiya, and J. P. Jagannathan. 2013. Peritoneal lymphomatosis: CT and PET/CT findings and how to differentiate between carcinomatosis and sarcomatosis. *Cancer Imaging* 13: 162–170.
16. Vojkovics, D., Z. Kellermayer, D. Heidt, M. Mihalj, B. Kajtár, D. Ernszt, T. Kovács, 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.
17. 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.
18. Choi, I., H. K. Chung, S. Ramu, H. N. Lee, K. E. Kim, S. Lee, J. Yoo, D. Choi, Y. S. Lee, B. Aguilar, and Y. K. Hong. 2011. Visualization of lymphatic vessels by Prox1-promoter directed GFP reporter in a bacterial artificial chromosome-based transgenic mouse. *Blood* 117: 362–365.
19. 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: 49–61.
20. 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—long term live cell tracking for flow cytometry and fluorescence microscopy. *J. Biol. Methods* 3: e38.
21. Gallatin, W. M., I. L. Weissman, and E. C. Butcher. 1983. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304: 30–34.
22. 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.
23. Inoue, Y., K. Izawa, S. Kiryu, A. Tojo, and K. Ohtomo. 2008. Diet and abdominal autofluorescence detected by in vivo fluorescence imaging of living mice. *Mol. Imaging* 7: 21–27.
24. Guja, K., T. Liehr, M. Rincic, N. Kosyakova, and S. S. Hussein Azawi. 2017. Molecular cytogenetic characterization identified the murine B-cell lymphoma cell line A-20 as a model for sporadic Burkitt's lymphoma. *J. Histochem. Cytochem.* 65: 669–677.
25. Prevo, R., S. Banerji, D. J. Ferguson, S. Clasper, and D. G. Jackson. 2001. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J. Biol. Chem.* 276: 19420–19430.
26. Wigle, J. T., N. Harvey, M. Detmar, I. Lagutina, G. Grosveld, M. D. Gunn, D. G. Jackson, and G. Oliver. 2002. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* 21: 1505–1513.
27. Van Rooijen, N., and A. Sanders. 1994. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Methods* 174: 83–93.
28. Muppidi, J. R., R. Schmitz, J. A. Green, W. Xiao, A. B. Larsen, S. E. Braun, J. An, Y. Xu, A. Rosenwald, G. Ott, et al. 2014. Loss of signalling via Gα13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature* 516: 254–258.
29. Vicens, R. A., M. Patnana, O. Le, P. R. Bhosale, T. L. Sagebiel, C. O. Menias, and A. Balachandran. 2015. Multimodality imaging of common and uncommon peritoneal diseases: a review for radiologists. *Abdom. Imaging* 40: 436–456.
30. Vaahtomeri, K., S. Karaman, T. Mäkinen, and K. Alitalo. 2017. Lymphangiogenesis guidance by paracrine and pericellular factors. *Genes Dev.* 31: 1615–1634.
31. Clark, R., V. Krishnan, M. Schoof, I. Rodriguez, B. Theriault, M. Chekmareva, and C. Rinker-Schaeffer. 2013. Milky spots promote ovarian cancer metastatic colonization of peritoneal adipose in experimental models. *Am. J. Pathol.* 183: 576–591.
32. 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.
33. Liu, X. Y., Z. F. Miao, T. T. Zhao, Z. N. Wang, Y. Y. Xu, J. Gao, J. H. Wu, Y. You, H. Xu, and H. M. Xu. 2013. Milky spot macrophages remodeled by gastric cancer cells promote peritoneal mesothelial cell injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439: 378–383.
34. Oosterling, S. J., G. J. van der Bij, M. Bögels, J. R. van der Sijp, R. H. Beelen, S. Meijer, and M. van Egmond. 2006. Insufficient ability of omental milky spots to prevent peritoneal tumor outgrowth supports omentectomy in minimal residual disease. *Cancer Immunol. Immunother.* 55: 1043–1051.
35. Horikawa, N., K. Abiko, N. Matsumura, J. Hamanishi, T. Baba, K. Yamaguchi, Y. Yoshioka, M. Koshiyama, and I. Konishi. 2017. Expression of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer inhibits tumor immunity through the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Clin. Cancer Res.* 23: 587–599.
36. Bazhanov, N., J. H. Ylostalo, T. J. Bartosh, A. Tiblow, A. Mohammadipoor, A. Foskett, and D. J. Prockop. 2016. Intraperitoneally infused human mesenchymal stem cells form aggregates with mouse immune cells and attach to peritoneal organs. *Stem Cell Res. Ther.* 7: 27.
37. Klopp, A. H., Y. Zhang, T. Solley, F. Amaya-Manzanares, F. Marini, M. Andreeff, B. Debeb, W. Woodward, R. Schmandt, R. Broaddus, et al. 2012. Omental adipose tissue-derived stromal cells promote vascularization and growth of endometrial tumors. *Clin. Cancer Res.* 18: 771–782.
38. Terai, S., S. Fushida, T. Tsukada, J. Kinoshita, K. Oyama, K. Okamoto, I. Makino, H. Tajima, I. Ninomiya, T. Fujimura, et al. 2015. Bone marrow derived "fibrocytes" contribute to tumor proliferation and fibrosis in gastric cancer. *Gastric Cancer* 18: 306–313.
39. Cao, L., X. Hu, J. Zhang, G. Huang, and Y. Zhang. 2014. The role of the CCL22-CCR4 axis in the metastasis of gastric cancer cells into omental milky spots. *J. Transl. Med.* 12: 267.
40. Poloni, A., G. Maurizi, S. Anastasi, E. Mondini, D. Mattiucci, G. Discepoli, F. Tiberi, S. Mancini, S. Partelli, A. Maurizi, et al. 2015. Plasticity of human dedifferentiated adipocytes toward endothelial cells. *Exp. Hematol.* 43: 137–146.
41. Sandoval, P., J. A. Jiménez-Heffernan, Á. Rynne-Vidal, M. L. Pérez-Lozano, Á. Gilsanz, V. Ruiz-Carpio, R. Reyes, J. García-Bordas, K. Stamatakis, J. Dotor, et al. 2013. Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal metastasis. *J. Pathol.* 231: 517–531.

Downloaded from http://www.jimmunol.org/ at PTE Pekar Mihaly on January 13, 2020