

Epithelio-mesenchymális kölcsönhatások a bursa Fabricii fejlődésében: az immunológusok és a fejlődésbiológusok között általánosan elfogadott, hogy a bursa Fabricii entodermális eredetű primér nyirokszerv. Hámtelepének a kialakulása szoros topográfiai kapcsolatban van az ectodermális eredetű analis invaginatio és az entodermális eredetű cloaca caudalis falának összefekvéséből keletkező cloacalis vagy analis membránnal. Ebből az anatómiai viszonyból adódott, hogy a korábbi embriológusok a bursa Fabriciit a cloaca diverticulumának tekintették. Ez a felfogás ma is áll. Hasonlóan a bursához, a thymus mint primer nyirokszerv is az ecto- és entoderma juxtaposíciója (branchialis tasak és barázda) helyén indul fejlődésnek. Mindkét primer nyirokszerv esetében már korábban is felmerült, hogy mind az ecto- és endoderma hozzájárulhat epithelialis telepük kialakulásához. Az utóbbi években kísérletes vizsgálatok bizonyították, hogy a thymus kizárólag endodermális eredetű hámreticulumból fejlődik.

1) A 80-as évek fejlett hisztotechnikája (félvékony metszetsorozat) alapján felvetettük, hogy a bursahám nem a cloaca diverticuluma, hanem az analis invaginatio ectodermájának származéka. Ezt a szövettani megfigyelést egy immuncitokémiai adatunk is megerősítette. Az embryonális cloaca entodermája a béltraktushoz hasonlóan Sonic hedgehog (Shh) növekedési faktort expresszálja, míg a cloaca diverticulumának tartott bursa Fabricii epitheliuma Shh negatív maradt. Hipotézisünk igazolására farkbimbó ectodermájának ablatióját, csirke-fürj chimérát, immuncitokémiát, sonic hedgehog in situ hybridizációt és in vitro szöveti recombiniációt végeztünk (csirke farkbimbó - azaz bursa mesenchyma és fürj hám a.) farkbimbó és b.) somatopleuralis ectoderma valamint c.) utóbél és d.) cloacalis entoderma). Ezt a recombinans szövetet, mely valójában „mesterséges bursa telep” (csirke mesenchyma és fürj hámok) 24 órás tenyésztés után csirke coeloma üregébe

ültették és vizsgáltuk a bursa folliculusok kialakulását. 15 napos inkubálást követően bursa follikulusok kizárólag a farokbimbó ectoderma és csirke mesenchyma recombinans szövetből alakultak ki, igazolva a bursahám ectodermális eredetét. A recombination kísérlet olvasata, 1) A farokbimbó ectodermája nagyon korán elkötelezett a bursa telepének kialakítására, mert a somatopleura ectodermája, már nem képes bursa follikulust generálni. 2) In vivo embryonális korban megnéztük milyen szerepe van a Shh növekedési faktornak a cloaca organogenezisében és miként befolyásolja jelenléte a Shh negatív bursa fejlődését. Az embryokat, csirke Shh gént tartalmazó RCAS (Rous-sarcoma vírustól módosított, replikáció-kompetens vírus) retrovírusokkal fertőztük. Az E. coli törzsekben felszaporított retrovírus plazmidot, első lépésben a DF1 fibroblaszt sejtvonalon tenyésztettük, majd az ultracentrifugálással bekoncentrált víruspartikulumokat a 2 napos csirke embryo leendő farokbimbó mesenchymájába injektáltuk.

RCAS-Shh, RCAS-GFP és siRNS-RCAS-Shh retrovírusokkal funkció-nyeréses és funkció-vesztéses mutációkat idéztünk elő a fejlődő 2 napos embryokban. Az első esetben túlzott koncentrációban expresszáldott a Shh. A magas Shh koncentráció serkentette a mesenchymasejtek proliferációját s ezzel farokbimbó megnagyobbodást, a hátsó végtagokon pedig gyakran polydactyliat idézett elő. A bursa Fabricii telepe csak a cloaca csökevényes hámnyúlványaként fejlődött, Bu-1 antigénre pozitív B lymphocyták pedig nem jelentek meg a bursatelep környékén. A súlyos fejlődési rendellenességek miatt az RCAS-Shh injektált embryok többsége viszont még a 10. embryonális nap előtt elpusztult. A Shh positive entodermális hámsejtek nem képeztek follikulust és a „mesterséges bursa telepek”-et Shh-val kezelve a follikulum képzés gátolt volt, igazolva a Shh bursa fejlődést gátló hatását. Ennek a kísérleti munkának az eredménye, hogy a thymus, mint a T sejtek érésének

és differenciálódásának a szerve entodermális telepből fejlődik, míg, legalábbis madárban, a másik primér nyirokszerv, melyben a B lymphocyták érése, differenciálódása történik ectodermális telepből alakul ki. Ma még nem tudjuk, hogy a két primér nyirokszerv (thymus-endodermális, T sejt érés és bursa-ectodermális, B sejt érés) a kialakulásának evolúciós szempontból van-e, és ha igen milyen jelentősége?

2) Új eljárást dolgoztunk ki a bursa Fabricii fejlődésének befolyásolására, illetve bursectomiára. Kémiai bursectomiát, és/vagy a bursa fejlődés súlyos gátlását lehet előidézni a 3-5 napos embriók 2%-os alkoholos testoszteron oldatba mártásával 5-6 másodperc alatt. Ennek a kísérleti modellnek nagy előnye, hogy semmilyen invasive beavatkozást nem igényel, de a testoszteron antiproliferatív hatása az egész embrió fejlődését gátolja. Eljárásunk lényege, hogy heparin-bead-et testoszteron vagy különböző növekedési faktorok oldatával átítatva, majd a kezelt beadet, egyet vagy többet, lokálisan az embrióba ültetve befolyásolni tudjuk az egyes szervek fejlődését, kiküszöbölve az egész embrióra gyakorolt hatását. A beadek számának változtatásával a biológiailag aktív anyagok koncentrációját is változtatni tudjuk.

3) A hemopoietikus sejtek embryonális kolonizációjának immuncitokémiai vizsgálata során megfigyeltük, hogy a **CD45+ vérképző őssejtek** nemcsak a lymphomyeloid szervek és szövetek telepeit, hanem **minden más szerv mesenchymáját is benépesítik.** Ezek a CD45+ hemopoietikus sejtek morfológiailag kerek és nyúlványos (dendritikus) megjelenést mutattak. A kereksejtes formák először a szikhólyag vérszigeteiben, míg az ugyancsak CD45+ dendritikus formák kevés késéssel az intraembryonális mesenchymában tűnnek fel. A kerek és nyúlványos hemopoietikus sejtek egymáshoz való viszonyát csirke-fürj parabiótikus kimérákkal vizsgáltuk. A 24 órás csirke és fürj embryokat közös csirketojásban inkubáltuk 10-12

napig. A kimérák immuncitokémiai analízise azt mutatja, hogy csak a kereksejtek „keveredtek” a parabiont embriókban, míg a nyúlványosok a közös keringés ellenére sem kolonizálták kölcsönösen a szervek mesenchymáját. Ez a kísérletes eredmény felveti azt a hipotézist, hogy az embriókban a kerek és nyúlványos sejt vonal már a keringés megindulása előtt szétválik és a kereksejtes forma nem precursora a dendritikusnak. Az eddigi eredmények megírás alatt vannak, PhD hallgató dolgozik rajta.

3a) A hemopoiitikus sejtek intraembryonális fejlődésének nyomon követése során kimutattuk, hogy a csirke **bélidegrendszer ganglionjaiban** a CD45+ hemopoiitikus sejtek önálló strukturális elemek. A sejtek fenotipizálása felfedte, hogy a feltűnően nyúlványos (dendritikus jellegű) CD45+ sejtek a központi idegrendszer microglia sejtjeihez hasonlóan MHC II-t expresszálnak, ami antigén prezentáló képességükre utal. Klasszikus makrofág markereket nem expresszálnak, de B-sejtekre jellemző Bu-1 (chB6 alloantigén) antigént fejeznek ki. A sejtek hemopoiitikus eredete mellett nemcsak a CD45 antigén jelenléte tanúskodik, hanem ezt csirke-fürj kimérés kísérleteink is igazolták. A kísérletekből kapott adatok további bizonyítékot nyújtanak arra, hogy a vérképző rendszer sejtjei integráns részét képezik mind a központi, mind a perifériás idegrendszernek. Az MHC II antigén jelenléte hozzájárulhat az idegrendszer neuroimmunológiai működéséhez (homeosztázisához).

4) Korai csirke és fürjembryok tusinjektálása után észrevettük, hogy a **szomatopleura redők különálló ér- és vérképzést mutatnak**, mivel tus feltöltést követően ez a terület tusmentes vérszigeteket tartalmaz. Ezek a hemopoiitikus sejtcsoportosulások először a két és fél napos embrionális fejlődés során észlelhetők a felső és alsó végtagbimbók közötti laterális mezodermban. Sztereomikroszkóppal megfigyelve a szikhólyag vérszigeteire emlékeztető vörösvérsejtekkel teli hálózatot

mutatnak. Immuncitokémiai és in situ hybridizációs technikákkal igazoltuk, hogy a fejlődés morfológiai jegyei hasonlóak az extraembrionális vérszigetek esetében leírtakhoz, emellett kimutathatók bennük a korai vérképző sejtekre jellemző transzkripciós faktorok (SCL és Lmo2) és sejtfelszíni molekulák (CD45, CD44, CD41/61). Eddigi eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a vérszigetek kialakulása sokkal szélesebb körben van jelen az embrionális mezodermban, mint ahogyan azt korábban gondoltuk.

5) A csirke thymus dendritikus sejtjeinek morfológiai keresése során érdekes és váratlan leletet észleltünk. A csirke dendritikus sejt specifikus monoklonális antitestet; 74.3 1992-ben Jeurissen készített és jelenleg kereskedelmi forgalomban is elérhető. Rutinszerűen használjuk a folliculáris dendritikus sejtek (FDC) és a bursai szekréciós dendritikus sejtek (BSDC) monitorizálására (a cég ilyen célra forgalmazza). Thymus velőállományban sejtcsoportokat fest, míg a kéregben szétszórt sejteket. Elektronmikroszkópos immuncitokémiával próbáljuk morfológiai fenotípusaikat meghatározni. Az eddigi eredmények lesújtóak, sikertelenek voltak. A sejtek eredetének meghatározására branchiális kímérákat készítettünk. 3 napos fűrj embyo branchiális struktúráját (kopoltyú ív, tasak és árok) megfelelő korú csirke embyo coeloma üregébe ültetve és 14 napos inkubálás után a thymus telep kialakulását és hemopoiétikus elemekkel való kolonizálódását vizsgáltuk. Histológiai kép és immuncitokémiai analízis differenciált thymus kialakulását mutatta, melyet CD45 és 74.3 dupla positive csirke eredetű sejtek kolonizáltak, bizonyítva a 74.3 positive sejtek hemopoiétikus, thymuson kívüli eredetét.

6) A 74.3 positive thymusbeli sejtek eredetének meghatározására (hemopoiétikus, extra thymikus vagy intrathymikus) végzett kímérés kísérletek egy új irányt is kijelöltek a labor számára. A fűrj branchiális struktúrája a csirke coeloma üregébe

ültetve alkalmakként a fejlődő csirke tüdőhöz tapadt és eltávolítása a 14 napos inkubáció után egy tüdő darabbal együtt volt lehetséges. Az eltávolított transzplantátumban a 74.3 mAb felismerte a csirke eredetű dendritikus sejteket és meglepetésünkre a tüdőben pedig a II. típusú pneumocytákat is a parabronchusok és az átriumok epithel sejtjei között. Eddigi eredményeink szerint a surfactant termelő epithel sejtek specifikus reakciót adnak a 74.3 mAb-vel, de nem surfactant A- és B proteint, hanem feltételezésünk szerint a csirke tüdő veleszületett immunitásáért felelős collectint (komplementszerű fehérje) és/vagy csirke tüdő lectint ismerhet fel. Jelenleg csak annyit állíthatunk biztonsággal, hogy a 74.3 mAb, amit a svájci cég csirke FDC specifikus antitestként definiál és ad el, kiváló eszköz a tüdő surfactant termelő sejtjeinek követésére. A 74.3 által a tüdő II típusú pneumocytáiban felismert antigén, „kapocs” lehet a veleszületett és szerzett adaptív immunitás között, meghatározása része a labor jövőbeni munkájának. (PhD hallgató témája lesz 2011 szeptemberétől). Ennek a véletlenszerű felfedezésnek a madár influenza vírus fertőzés során lehet akár közvetlen gazdasági jelentősége is.

7) A hybridómák tesztelése során kiderült, hogy nemcsak hám ellenes, hanem B lymphocytá ellenes hybridómák is megjelentek, melyet klónozva kaptunk egy új B lymphocytá ellenes mAb-t. Eddig a piacon négy különböző faji restrikcióval bíró mAb volt elérhető, melyek a jelenleg ismert hét, chB6 alloantigén valamelyikét ismerik fel. A laborban előállított és klónozott hybridómák egyike: BoA1 is valamelyik chB6-alléját ismeri fel, mely az eddig tesztelt madarak mindegyikének B sejtjeivel reagál.

**Table 1.** Monoclonal antibodies recognizing chB6 transmembrane molecules in avian species<sup>1</sup>

Item	Chicken a allele	Chicken b allele	Obese chicken	Turkey	Guinea fowl	Quail
11G2	–	+	–	–	–	–
L22	+	–	+	–	–	+
AV20	+	+	+	–	–	–
HIS-C1 <sup>2</sup>	+ (no information for alleles)		?	+	?	–
BoA1	+	+	+	+	+	+

<sup>1</sup>The symbols + and – indicate whether or not the avian species reacted with the listed monoclonal antibody.

<sup>2</sup>Jeurissen and Janse (1998). HIS-C1 mAb has not been tested in our lab; thus, we have not had information concerning the allelic background of HIS-C1.

A BoA1 mAb egy új tagja a chB6 alloantigént felismerő monoklonális antitesteknek, mely nem mutat faji restrikiót, legalábbis az eddig vizsgált fajokat illetően.

8) A korábbi OTKA pályázat (023774) támogatásával kezdtük el szisztematikusan vizsgálni a bélhez asszociált nyirokszerveket és akkor leírtuk a proventriculus és oesophagus határán lévő általunk oesophagus tonsillának nevezett gut-associated lymphoid organ (GALT), mely emlősökben hiányzik. Ebben az OTKA által támogatott periódusban pedig felhívtuk a figyelmet egy újabb tagjára a GALT-nak, mely a gyomor és a duodenum határán komplett lymphatikus gyűrűt alkot; pylorikus tonsillának neveztük. A korábbi irodalmi adatokat (bursa Fabricii, Peyer's patches, és DIA: Diffuze Infiltration of Anal region) az OTKA-val támogatott oesophagus és pylorikus tonsillákkal összevetve állítjuk, hogy a madárban az intenzíven fejlett GALT kompenzálja a nyirokcsomók hiányát.

9) Ma már köztudott, hogy a gyulladáshoz vezető folyamatokban és a fertőzések terjedésében, pathomechanizmusában az extracelluláris mátrix (ECM) szerkezetének eszenciális szerepe van. Az előző OTKA-val támogatott ciklusban részletesen foglalkoztunk a lép extracelluláris mátrixával és megállapítottuk, hogy a T dependens periarteriális lymphocita hüvely (PALS) és a B dependens germinal center (GC), valamint az antigén trapping zona a Schweigger-Seidel hüvely és

környezete a periellipsoidal fehér pulpa (PWP) extracelluláris mátrixa jelentős különbségeket mutat. Számos immuncitokémiai közlemény foglalkozott fertőző bursa betegség (IBD) hatásával a lép sejtes elemeire, de egyetlen egy sem tanulmányozta az ECM-re gyakorolt hatását. Egyik legutóbbi munkánkban górcső alá vettük a lép ECM funkcionális kompartmenjeinek elváltozásait IBDV fertőzést követően. E vizsgálatok eredménye, hogy a fehér pulpa azon kompartmenjének ECM-je mutat érzékenységet IBDV-re, melynek collagen termelő reticulumsejtjei hemopoiotikus eredetűek, míg a lép telepében in loco fejlődő mesenchymalis eredetű reticulum sejtek által termelt ECM alig vagy egyáltalán nem mutatott változást. Végsősoron, ez azt jelenti, hogy a hemopoiotikus eredetű reticulumsejtek érzékenyebbek vagy kevésbé toleránsak IBDV fertőzésre, mint a mesenchymalis eredetűek.

10) A laborban előállított monoclonalis antitest panelben két gyöngytyúk thrombocytá ellenes antitestet találtunk, melyet karakterizáltunk. GTr1 és GTr2 antitestek kizárólag gyöngytyúk thrombocytákat ismernek fel. Csirke, pulyka és fűj thrombocytában tesztelve nem keresztreakáltak a felsorolt állatok thrombocytáival. Ezek az mAb gyöngytyúk- és csirke, gyöngytyúk és fűj, vagy gyöngytyúk és pulyka kimérákban vagy parabiózis kísérletekben használhatók gyöngytyúk sejtek identifikálására.

11) A jelenlegi OTKA pályázat hozzájárult három az eredeti OTKA pályázatban nem szereplő munkához is, melyek kollaborációban készültek az ELTE Immunológiai Intézetével és a Harvard University, Department of Pediatric Surgery-vel. Dr. Nagy Nándornak az utóbbi intézettel tartós kapcsolata alakult ki, mely a bél és a bursa Fabricii fejlődésének, beidegzésének problematikájával foglalkozik. Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy a bélidegrendszer kialakulása szorosan összefügg a kapilláris endothel működésével. Amennyiben a VEGF növekedési faktor receptor



szinten történő gátlása megakadályozza a ganglionléc sejteknek a bél falába történő bevándorlását, mely megacolon congenitumhoz (Hirschprung-betegség) vezet.

2008 februárjában jelent meg a világon az első madár immunológiával foglalkozó kézikönyv, melyben a morfológiai és immuncitokémiai fejezet megírására a könyv szerkesztője 2006-ban kért fel: Structure of the Avian Lymphoid System, Oláh, I. and Vervelde, L., in: Avian Immunology ed. by F. Davison, B. Kaspers, and K. A. Shat, Elsevier, Amsterdam, 2008, pp. 13-50.