

Ph.D. értekezés:

*Az állatfajok széles körében immunsejtek kimutatására felhasználható,
rögzített szövetek vizsgálatára is alkalmas állatorvosi
immundiagnosztikumok kifejlesztése és jellemzése*

Írta: Keresztes Gábor

*Ezt a munkát a JATE TTK Molekuláris és Sejtbiológiai Program keretében állami
Ph.D. ösztöndíjasként az MTA SZBK Genetikai Intézetében, az Immunológiai
Csoportban Andó István témavezetése mellett végeztem.*

1997.

Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás	1.
2. Irodalmi áttekintés	
2.1. Az immunrendszer szerepe és felépítése a gerinces állatokban	6.
2.2. Az immunsejtek molekuláris markerei és elnevezésük	7.
2.3. A CD3 ϵ fehérje szerkezete és feladata	10.
2.4. A CD43 fehérje szerkezete és feladata	13.
2.5. Az immunrendszer elemeit felismerő immunreagensekre alapuló diagnosztikai módszerek	18.
2.6. Az immunrendszer elemeit felismerő immunreagensek jelentősége a humán diagnosztikában	20.
3. Célkitűzések	22.
4. Felhasznált anyagok és módszerek	
4.1. A felhasznált vegyszerek, ellenanyagok, plazmidok, sejtek, szövetek és kísérleti állatok eredete	22.
4.2. Mikrobiológiai módszerek	24.
4.3. Molekuláris biológiai módszerek	26.
4.4. Sejtenyésztési és sejtszeparálási módszerek	30.
4.5. Fehérje-biokémiai módszerek	31.
4.6. Immunkémiai módszerek	37.
4.7. Immuncitokémiai módszerek	39.
4.8. Hisztológiai és immunhisztokémiai módszerek	42.
4.9. Az immunreagensek előállítása és tesztelése	46.
5. Eredmények és az eredmények megbeszélése	
5.1. A szarvasmarha fehérvérsejt-felszíni antigéneket felismerő monoklonális ellenanyagokkal (mEa-okkal) szerzett tapasztalatok	49.
5.1.1. A felhasznált monoklonális ellenanyagok	49.
5.1.2. Rögzített szövettani metszeteken alkalmazható mEa-ok	49.
5.1.3. A mEa-ok által felismert epitópok jelenléte a különböző gerinces állatfajokban	55.
5.1.4. A mEa-ok alkalmazási lehetőségei az állatorvosi diagnosztikában	57.

5.2. A p.aCD3ε(177-190) szérummal szerzett tapasztalatok	58.
5.2.1. A p.aCD3ε(177-190) szérum	58.
5.2.2. A p.aCD3ε(177-190) szérum által felismert epitóp(ok) jelenléte a különböző gerinces állatfajokban	58.
5.2.3. A p.aCD3ε(177-190) szérum alkalmazási lehetőségei az állatorvosi diagnosztikában	61.
5.3. A p.aCD43(352-372) szérummal szerzett tapasztalatok	66.
5.4. A p.aCD43cp szérummal szerzett tapasztalatok	67.
5.4.1. A CD43cp rekombináns fehérje előállítása és tisztítása	67.
5.4.2. A p.aCD43cp szérum előállítása, affinitástisztítása és jellemzése	74.
5.4.3. A p.aCD43cp szérum felismerte epitópok jelenléte a különböző állatfajokban	80.
5.4.4. A p.aCD43cp szérum alkalmazási lehetőségei az állatorvosi diagnosztikában	84.
6. Következtetések	87.
6.1. Fehérjekeverékekkel és tisztított antigénekkkel végzett immunizálás előnyei és hátrányai	87.
6.2. A peptidokkal és rekombináns fehérjékkel végzett immunizálás előnyei és hátrányai	89.
6.3. A monoklonális ellenanyagok és az affinitás-tisztított szérumok előnyei és hátrányai	93.
6.4. Végző	95.
7. Összefoglalás angol nyelven (Summary in English)	96.
8. Rövidítések jegyzéke	101.
9. Köszönetnyilvánítás	102.
10. Az értekezésben felhasznált közlemények	103.
11. Referenciák	104.

1. Összefoglalás

A többsejtű élőlények integritását számtalan környezeti tényező veszélyezteti. Az immunrendszer fő feladata ezek közül kiküszöbölni azokat, amelyek a szervezet erőforrásait saját túlélésük és szaporodásuk érdekében használják fel, és amelyek ezáltal a szervezet számára veszélyt, stresszt vagy pusztulást jelentenek. A gerinces állatokban az immunfunkciók többségét a fehérvérsejtek látják el, amelyek a vér és a nyirok útján az egész szervezetben képesek a veszélyes struktúrák felkutatására és felismerésére, majd helyben vagy az immunszervekben egymással együttműködve hatékony immunválasz kialakítására.

Sokáig az immunválaszban fontos szerepet játszó sejteket csak alaktani sajátásaik alapján tudták elkülöníteni egymástól. A fehérvérsejt-felszíni antigének széleskörű szerológiai jellemzését a monoklonális ellenanyagok előállításának kidolgozása tette lehetővé. Ezen fehérjéket markerként használva mód nyílt a fehérvérsejtek fő fejlődési vonalainak azonosítására és az egyes vonalakon belül a különböző fejlődési szakaszok és aktivációs állapotok megkülönböztetésére. A különböző fehérvérsejt-antigének ellen rendelkezésre álló ellenanyagok segítségével lehetővé vált az immunsejtek kóros eloszlásainak nyomon követése immuncitokémiai és immunhisztokémiai módszerekkel, így a szerológiai markereket felismerő ellenanyagok megjelenése a humán patológiai diagnosztikát is forradalmasította.

Az emberi fehérvérsejt-antigének megismerésével párhuzamosan az állatokban is megindult az immunrendszer molekuláris szintű jellemzése. Az állatfajok nagy száma és az ehhez viszonyítva rendelkezésre álló erőforrások szűkössége miatt az egyes állatfajok immunrendszerével kapcsolatos alak- és oktani ismereteink korlátozottak. Kevés az állatok immunsejtjeit felismerő reagens, ezért az immundiagnosztikai módszerek az állatorvosi patológiában még nem terjedhettek el széles körben.

Munkám során ezért olyan megbízható módon működő immunreagenseket kerestem, amelyek az állatfajok széles köréből származó szövetekben, köztük a rögzített mintákban is alkalmasak a különböző fehérvérsejtek kimutatására. Ezeknek a követelményeknek olyan ellenanyag-készítmények felelnek meg, amelyek egyrészt a törzsfajlás során állandósult, másrészt a sejtek és szövetek rögzítésekor visszafordíthatatlan változást nem szenvedő epitópokat ismernek fel.

Kísérleteim során több különböző megközelítéssel előállított ellenanyag-készítmény közül kíséreltem meg ennek a kettős követelményrendszernek eleget tevő immunreagenseket találni. Az immunreagensekkel szerzett tapasztalatok egyúttal



lehetőséget adtak a különböző megközelítések előnyeinek és hátrányainak összehasonlítására az állatorvosi patológiai alkalmazhatóság szempontjából.

Fehérvérsejtek membránantigénjeinek extracelluláris epitópjait felismerő monoklonális ellenanyagok

A "Third International Workshop on Ruminant Leukocyte Antigens" keretében olyan monoklonális ellenanyagokat vizsgáltunk, amelyeket különböző kérődző állatfajokból származó fehérvérsejt-szuspenziókkal immunizált egér B-limfocitáklónjainak immortalizálásával előállított hibridómaklónok termeltek, és amelyek szarvasmarha fehérvérsejt-felszíni antigének extracelluláris epitópjait ismerték fel.

A háromszázöt vizsgált monoklonális ellenanyag közül harmincnycolc adott reprodukálható és az előzetes áramlási citofluorimetriai és a natív immunhisztokémiai kísérletekben kapott adatokkal összhangban lévő eredményt neutrális pufferelt formalinnal rögzített szarvasmarha nyirokszöveteken. A legtöbb esetben a jelölődés megléte és erőssége nagy mértékben függött az immunhisztokémiai festést megelőző különböző epitóp visszanyerési módszerek alkalmazásától. A rögzített szöveteken is felhasználható monoklonális ellenanyagok segítségével lehetővé vált a B- és T-limfociták, a monociták, a makrofágok, a granulociták, a vörösvértettek és a vaszkuláris endothel sejtek, illetve ezen sejtípusok jól körülírható alcsoportjainak azonosítása szarvasmarhában.

A háromszázöt szarvasmarha fehérvérsejt-felszíni antigént felismerő ellenanyaggal különböző emlősfajokból származó fehérvérsejteket jelöltünk meg, hogy az állatfajok széles körében fehérvérsejt-antigéneket felismerő ellenanyagokat azonosítsunk. A keresztreakciót adó ellenanyagok aránya jól tükrözte a vizsgált fajok szarvasmarhához viszonyított rokonsági helyzetét, hiszen a közelebbi rokonsági fokhoz az epitópok nagyobb mértékű szerológiai keresztreakciós gyakorisága társult. Tíz olyan ellenanyagot találtunk, amelyek valamennyi vizsgált emlősfajban fehérvérsejteket ismertek fel. E tíz ellenanyag esetében a különböző állatfajokban észlelt reaktivitás azonos sejtpopulációkra és nagy valószínűséggel azonos – de legalábbis hasonló – molekulásúlyú antigénekre korlátozódott, ami a keresztreakció specificitására és ezáltal a felismert antigén nagy fokú állandósultságára utalt.

Mindössze két reagens (DH16, VPM36) szerepelt mind a rögzített szarvasmarhaszöveteken használható, mind az emlősfajok fehérvérsejtjein található állandósult epitópot felismerő monoklonális ellenanyagok között. A fehérje-keverékekkel (pl. sejtuszuspenzió)

immunizált állatokban az immunválasz csak véletlenszerűen irányul olyan epitópok ellen, amelyik a rögzítés során nem módosul visszafordíthatatlanul és a fajok szélesebb körében is állandósult. A fehérje-keverékekkel végzett immunizálással előállított immunreagensek ezért csak ritkán felelnek meg a széleskörű állatorvosi rutin alkalmazás szempontjából fontos követelményeknek.

Fehérvérsejtek membránantigénjeinek intracelluláris epitópjait felismerő affinitás-tisztított szérumok

Az immunválaszt irányítottá tehetjük, ha az immunizálást tisztított fehérjékkel végezzük. Mivel a fehérvérsejt-fehérjék általában nem tisztíthatók homogenitásig a hagyományos biokémiai módszerekkel, a tiszta antigén-készítményt más módon kell előállítanunk. A megfelelő fehérjék szekvencia-adatainak ismeretében peptideket szintetizálhatunk vagy a fehérjéket vagy azok egyes doménjeit baktériumban túltermeltethetjük, és a peptideket vagy a rekombináns fehérjéket immunizálásra használhatjuk fel. Dolgozatomban a CD3 ϵ és a CD43 fehérjék ellen termelt affinitás-tisztított szérumokat jellemeztem.

A CD3 láncok a T-sejt receptor láncokhoz kapcsolódó invariábilis fehérjék, amelyek a variábilis láncok antigénkötésének jelét közvetítik a sejt felé. A CD3 transzmembrán fehérjéket a T-limfoid fejlődési vonalba tartozó sejtek, illetve a természetes ölösejtek fejezik ki. Az emberi CD3 ϵ lánc 177.-190. aminosavainak megfelelő aminosav-sorrendű peptidet felismerő, Mason és tsi. által előállított p.aCD3 ϵ (177-190) affinitás-tisztított szérum alkalmasnak bizonyult a T-limfociták (és a természetes ölösejtek) kimutatására natív és archivált szövetekben. Ezt a reagenst a kóros szöveteket beszűrő sejtek eredetének meghatározására az emberi immunohisztopatológiában széles körben használják.

A CD3 ϵ fehérje aminosavsorrendje már több fajban ismert. A különböző fajokból származó szekvenciák összehasonlításakor kiderült, hogy a fehérje citoplazmatikus része erősen állandósult szakaszokat is tartalmaz. A p.aCD3 ϵ (177-190) szérum által felismert emberi CD3 ϵ fehérjerész is magas fokú állandósultságot mutat. A szérum az emberi CD3 ϵ fehérjéhez hasonló molekulásúlyú fehérjéket ismert fel több madár- és emlősfaj immunszerv-lizátumaiban, és valamennyi vizsgált madár- és emlősfajban limfoid sejteket jelölt a nyirokszervek T-sejtes területein mind natív, mind archivált szövettani metszeteken.

E kísérletek egyértelműen arra utaltak, hogy a CD3 ϵ lánc valamennyi madár- és emlősfajban állandósult.

A p.aCD3 ϵ (177-190) szérummal állati kórképekből származó szövettani metszeteket immunfestettünk, hogy feltérképezzük a szérum felhasználási területeit az állatorvosi patológiában. A legtöbb esetben a CD3 ϵ + sejteket még tíz éves szövettani mintákban is láthatóvá tudtuk tenni. Ez a reagens tehát hasznos eszköz lehet az egészséges és kóros limfoid szövetek és limfoid beszűrődések jellemzéséhez a kutató munkában és a napi állatorvosi gyakorlatban egyaránt.

A CD43 egy erősen O-glikozilált transzmembrán fehérje, amely megtalálható a vörösvértestek és az érett B-sejtek kivételével valamennyi hematopoetikus sejten. Bár a fehérje pontos feladata nem ismert, feltételezhető, hogy a sejt jeltovábbító és adhéziós folyamataiban játszik szerepet. A rendelkezésre álló emberi, egér és patkány fehérje aminosav-sorrendek összehasonlításakor kiderült, hogy a fehérje citoplazmatikus régiója állandósult szakaszokat is tartalmaz.

Az általunk előállított affinitás-tisztított p.aCD43(352-372) szérum egy ilyen állandósultnak talált szakasz (az emberi CD43 fehérje 352.-372. aminosavai) alapján szintetizált oligopeptidet (CD43(352-372)) ismer fel. Amíg a szérum a permeabilizált CD43- P3HR1 sejteket nem jelölte és a sejtvonal lizátumában nem ismert fel fehérjét, addig azonos kísérleti körülmények között a reagens segítségével CD43+ Jurkat sejteken erős, és a CD43(352-372) peptiddel dóziszfüggően gátolható membrán-festődést kaptunk, valamint a sejtvonal lizátumában a CD43 molekulasúlyával megegyező 135 kD molekulasúlyú fehérjét mutattunk ki. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a p.aCD43(352-372) szérum felismeri a natív és denaturált CD43 fehérje 352.-372. aminosavainak megfelelő szakaszát. Sajnos a p.aCD43(352-372) szérum titere olyan alacsony volt, hogy az a további munkát nem tette lehetővé.

A p.aCD43(352-372) ellenanyaggal szerzett kedvezőtlen tapasztalatok miatt úgy döntöttünk, hogy a CD43 fehérje citoplazmatikus részét GST fúziós fehérje formájában molekuláris biológiai módszerekkel állítjuk elő, és a túltermelt fehérjével történő immunizálással előállított szérum affinitás-tisztított frakcióját vizsgáljuk tovább (p.aCD43cp). Immunoprecipitációs és Western blott kísérletekben bizonyítottuk, hogy a p.aCD43cp szérum a CD43 molekulasúlyával megegyező molekulasúlyú fehérjét ismer fel CD43+ sejtvonalak lizátumaiban. Az affinitás-tisztított szérum a permeabilizált CD43+ sejtek membránját jelölte, míg a CD43- sejteket nem. Kettős jelölésű kísérletekben

bizonyítottuk, hogy a p.aCD43cp szérum a vér fehérvérsejtjei közül a T-limfocitákat, a monocitákat és a granulocitákat ismeri fel. A nyirokszövetekben a szérum ugyanezeket a sejtípusokat jelölte. Ezzel bizonyítottuk, hogy a reagens alkalmas a humán CD43 fehérje natív és denaturált formájának kimutatására.

Megvizsgáltuk, hogy a CD43 citoplazmatikus régiójának állandósult szakaszai kimutathatók-e a különböző gerinces állatfajokban szerológiai módszerekkel. Western blot kísérletben a szérum felismerte az ember és eger CD43 fehérjét, de más vizsgált fajokét nem. Indirekt immunfluoreszcenciás és immunhisztokémiai kísérletekben viszont a reagens a vizsgált emlősfajok túlnyomó többségében a T-limfocitákat és a mieloid sejteket jelölte. A p.aCD43cp szérum a CD43 fehérje azonosítását és részleges jellemzését több olyan fajban is lehetővé tette, amelyben a fehérjét eddig nem írták le. A biokémiai és immunhisztokémiai kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a CD43 fehérje felépítése és kifejeződési mintázata több emlősfajban állandósult.

A legtöbb esetben a p.aCD43cp reagens segítségével a CD43+ sejteket még több éves állati kóreseteket képviselő szövettani mintákból is könnyen láthatóvá tudtuk tenni, annak ellenére, hogy a szövetek rögzítésekor és beágyazásakor alkalmazott körülmények sokszor kedvezőtlenek voltak. Tapasztalataink szerint a p.aCD43cp szérum alkalmas lehet a különböző beszűrődések hematopoetikus eredetének igazolására és más reagensekkel együtt a hematopoetikus eredetű beszűrődések jellemzésére az állatorvosi kutató munkában és a napi gyakorlatban egyaránt.

A peptidekkel és rekombináns fehérjékkel végzett immunizálással előállított sejtfelszíni fehérvérsejt-antigének sejten belüli epitópjait felismerő affinitás-tisztított szérumokkal kapott eredmények biztatóak. Az anti-peptid szérumok az állatorvosi rutin diagnosztikában jól alkalmazható reagensekké válhatnak, amennyiben az állandósultnak jóvolt aminosavsorrend alapján szintetizált peptid egyrészt megfelelően immunogénnek bizonyul, másrészt a szérum által felismert epitópok nem szenvednek visszafordíthatatlan károsodást a rögzítés és beágyazás során (p.aCD3ε(177-190)). Ha ezek a feltételek nem teljesülnek (p.aCD43(352-372)), akkor célszerűbb az immunizálást a molekuláris biológiai eszközökkel létrehozott fehérjével vagy fehérjedoménnel végezni, mert a teljes fehérje vagy fehérjedomén valamennyi olyan epitópot tartalmazza, amely ellen képződött ellenanyag a céljainknak megfelelően. A p.aCD43cp szérummal szerzett tapasztalatok igazolták, hogy a rekombináns fehérjével történő immunizálással az állatorvosi rutindiagnosztikumokkal szemben támasztott követelményeket kielégítő immunreagenseket nyerhetünk.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az immunrendszer szerepe és felépítése a gerinces állatokban

A többsejtű élőlények integritását a környezetükben lévő számtalan veszélyforrás fenyegeti. Az immunrendszer feladata ezek közül kiküszöbölni azokat, amelyek a szervezet erőforrásait saját túlélésük és szaporodásuk érdekében használják fel és amelyek ezáltal a szervezet számára veszélyt, stresszt vagy pusztulást jelentenek. Az immunrendszernek tehát az opportunista és kórokozó vírusok, baktérium-, gomba-, protozoa és parazitafajok és talán a daganatos sejtek elleni védekezésben van szerepe (Matzinger 1994).

Az állatok immunrendszere a törzsfajlódás korai szakaszában csak úgynevezett ősi elemeket tartalmaz. Az ősi immunrendszer az opportunista és kórokozó szervezetek olyan jellemző sajátságait ismeri fel, amelyek megváltoztatására a paraziták a megtámadott szervezet immunrendszerének szelekciós nyomása ellenére sem képesek. (Ilyen sajátságok például csak a valódi baktériumokban (Eubacteria) előforduló formilmetioninnal történő transláció iniciáció, kizárólag a bakteriális sejtfalokban megtalálható lipopoliszacharidok vagy csak a gombafajok sejtfalában előforduló néhány jellegzetes oligoszacharid.) Az ősi immunválaszok gyorsak, és utánuk nem marad fenn memória. Nem szabad azonban azt gondolni, hogy ez a rendszer nem hatékony. A Földön élő állatfajok túlnyomó többségét alkotó gerinctelen állatokban ugyanis ez az ősi nevezett immunrendszer önmagában is képes a fajok túlélését biztosítani.

A gerinces állatfajokban – nagy valószínűséggel ennek a rendszertani egységnek az evolúciós sikeréhez alapvetően hozzájárulva – kialakult az ősi immunrendszer mellett az adaptív immunrendszer. Az adaptív immunrendszerrel rendelkező gazdaszervezet képes arra, hogy az immunrendszer szelekciós hatására állandóan változó struktúrákat is felismerje a parazitákon. Ennek a látszólag végtelen változékonyságnak a felismerését az átrendeződő receptorok (T-sejt és B-sejt receptorok), illetve az ezeket létrehozó szabályozott rekombinációs folyamatok kifejlődése tette lehetővé. Az adaptív immunrendszer sejtjei egy eddig még kevésbé tisztázott folyamat során megtanulják megkülönböztetni a veszélyes és veszélytelen (pl. saját) struktúrákat. A tanulási folyamat után immunológiai memória alakul ki, amely lehetővé teszi, hogy a már egyszer megismert veszélyes struktúrák újbóli megjelenésekor ez az egyébként lassan indukálódó rendszer azonnal működésbe léphessen.

A gerinces állatokban az immunfunkciók túlnyomó többségét a fehérvérsejtek látják el. A fehérvérsejtek a vér és a nyirok útján az egész szervezetben képesek a veszélyes struktúrák felkutatására és felismerésére, majd helyben vagy a zömmel fehérvérsejtekből álló immunszervekben (nyirokcsomók, lép és egyéb limfoid szövetek) egymással együttműködve hatékony immunválasz kialakítására. Ebben a folyamatban a nem átrendeződő receptorokkal rendelkező mieloid sejtek (granulociták, monociták, makrofágok, stb.) felelősek inkább az ősi jellegű feladatokért, míg az NK-sejtek kivételével átrendeződő antigénreceptorokat hordozó limfoid sejtek (T-, B- és NK-sejtek) inkább az adaptív immunválaszban játszanak szerepet. Hangsúlyozni kell azonban, hogy az immunválasz ősi és adaptív részre történő szétválasztása inkább evolúciós, mintsem funkcionális alapon tehető meg, mert az immunválasz során ezek a védekező folyamatok egymásra épülve, egymással szoros kölcsönhatásban működnek.

2.2. Az immunsejtek molekuláris markerei és elnevezésük

Évtizedeken keresztül az immunválaszban szerepet játszó sejteket csak alaktani sajátásaik alapján tudták megkülönböztetni. Az alaktani sajátások segítségével a fehérvérsejteket ugyan fel lehetett osztani fő csoportokra, a fő csoportok finomabb felosztása azonban nem vagy csak korlátozott mértékben volt lehetséges. Az áttörést a monoklonális ellenanyag technika (Köhler és Milstein 1975) bevezetése jelentette, amely lehetővé tette a fehérvérsejtek felszínén található fehérjék azonosítását.

A világ számos laboratóriumában állítottak elő egymástól függetlenül emberi fehérvérsejt-felszíni antigéneket felismerő monoklonális ellenanyagokat. Ez a mEa-k által felismert antigének nevezéktanában eleinte nagy zűrzavart okozott, ezért felmerült az igény az ellenanyagok, illetve az általuk felismert antigének csoportosítására és szabványos elnevezésére. Ezt a célt szolgálta és szolgálja a szabályos időközönként megrendezett "International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens", amelyen az ellenanyagokat egy megfelelő jellemzést követő klaszter-analízisnek nevezett matematikai módszer alapján egy antigént vagy egymással közeli rokon antigéneket felismerő csoportokba sorolják. A sejtfelszíni antigének ezen besorolás alapján kapnak egy CD (Cluster Defined) betűkből és egy sorszámból álló hivatalos elnevezést. Kivételt képeznek ez alól az átrendeződő receptorok (B-sejt receptor, T-sejt receptor) és a fő szövetösszeférhetetlenségi rendszer (Major

Histocompatibility Complex (MHC) I és II) antigénjei, amelyek esetében a nagy mennyiségű különböző forma ettől eltérő nevezéktant tesz szükségessé.

Az emberi fehérvérsejteken ma már több mint száz ilyen sejtfelszíni antigén-klasztert sikerült azonosítani. Ezen fehérjéket markerként használva lehetőség nyílt különböző fehérvérsejt fejlődési vonalak azonosítására és a vonalakon belül az egyes fejlődési stádiumok és aktivációs állapotok megkülönböztetésére. A fehérvérsejt-antigéneket felismerő ellenanyagok természetesen nemcsak a különböző fehérvérsejt-populációk pontosabb elkülönítésére szolgáltak és szolgálnak, hanem az antigének molekuláris, biokémiai és funkcionális vizsgálata alapvetően hozzájárult és hozzájárul az emberi immunrendszer működésének a megértéséhez.

Az emberi fehérvérsejt-antigének megismerésével párhuzamosan az állatokban is megindult az adaptív immunrendszer molekuláris szintű jellemzése (I. táblázat). Az állatfajok nagy száma és az ehhez képest rendelkezésre álló erőforrások szűkössége miatt azonban az állatfajok egymással részben átfedő két fő csoportjában indulhatott meg csak kiterjedt, nemzetközileg összehangolt kutató munka. Az egyik csoportba a gerincesek törzsének egy-egy osztályára jellemző típusfajok tartoznak. Ez a halak esetében a *Raja erinacea* (rája faj), a kétéltűek esetében a *Xenopus laevis* (karmos béka), a madaraknál a *Gallus domesticus* (házi tyúk), az emlősöknél pedig a *Mus musculus* (házi egér) és a *Rattus norvegicus* (házi patkány). A másik csoportba az olyan állattenyésztési szempontból jelentős fajok sorolhatók, mint a házi tyúk, a sertés, a szarvasmarha, a juh és a ló. Az állatok fehérvérsejt-antigénjeinek nevezéktanát az emberi fehérvérsejt-markerek elnevezéséhez hasonlóan konferenciákon egységesítik. Az elnevezések az emberi CD nomenklaturát veszik figyelembe. Amennyiben egy antigén nem azonosítható egyértelműen az emberben már jól jellemzett valamely fehérje homológjaként, az antigént egy WC (Workshop Cluster) betűjellel és egy számmal nevezik el. Ez az elnevezés lehet átmeneti, amikor az antigén további vizsgálata után valamely emberi fehérjével fennálló hasonlóság egyértelművé válik lehetővé téve a CD nomenklatura alkalmazását, de ritkábban állandósulhat is, ha olyan antigént sikerül azonosítani, amelynek emberi homológja nincsen. Amennyiben hangsúlyozni akarjuk, hogy az antigén milyen fajból származik, a CD vagy WC elnevezés elé egy fajra utaló rövidítés helyezhető (pl. BoCD14 - szarvasmarha (Bovine) antigén, amely az emberi CD14-gyel homológ).

I. táblázat

Adatok néhány fontosabb fehérvérsejt-markerről különböző állatfajokban

Marker	A fehérje funkciója	ember	egér	sertés	sz.marha	házi tyúk
T-limfocita markerek						
TCR $\alpha\beta$	antigén receptor	Meuer és tsi. 1983	Allison és tsi. 1982	Hirt és tsi, 1990	Tanaka és tsi. 1990	Lahti és tsi. 1988
TCR $\gamma\delta$	antigén receptor	Brenner és tsi. 1986	Saito és tsi. 1984	Saalmüller és tsi. 1990	Mackay és Hein 1989	Sowder és tsi. 1988
CD3 ϵ	antigén receptor jelátvitel	Kung és tsi. 1979	Gold és tsi. 1987	Kirkham és tsi. 1996	Davis és tsi. 1993	Chen és tsi. 1986
CD4	T helper sejt koreceptor	Reinherz és tsi. 1979	Dialynas és tsi. 1983	Pescovitz és tsi. 1984	Baldwin és tsi. 1986	Chan és tsi. 1988
CD8	citotoxikus T sejt koreceptor	Reinherz és tsi. 1980	Cantor és Boyse 1975	Jonjic és tsi. 1984	Ellis és tsi. 1986	Chan és tsi. 1988
B-limfocita markerek						
BCR	antigén receptor	Az adott fajból izolált immunglobulint felismerő szérum vagy monoklonális ellenanyag alkalmazható a B-sejt receptor (sejtfelszíni immunoglobulin) kimutatására				
CD21	C3 komplement receptor	Jondal és tsi. 1976	Fingeroth és tsi. 1989	Den Hanz és tsi. 1994	Naessens és tsi. 1990	nem ismert
CD79cy	antigén receptor jelátvitel	Hombach és tsi. 1988	Sakaguchi és tsi 1988	Jones és tsi. 1993	Jones és tsi. 1993	Jones és tsi. 1993
hematopoetikus sejtek (non lineage) markerei						
CD43	adhézió és jelátvitel	Axelsson és tsi. 1978	Conzelman és tsi. 1980	nem ismert	nem ismert	nem ismert
CD45	jelátvitel (tirozin foszfatáz)	Omary és tsi. 1980	Trowbridge és tsi. 1975	Zuckermann és tsi. 1994	Bembridge és tsi. 1993	Houssaint és tsi. 1987
főszövetösszeférhetlenségi rendszer fehérjéi						
MHC I	antigén bemutatás	Tonigaki és tsi. 1971	Klein és Schreffer 1971	Chardon és tsi. 1978	Amorena és Stone 1978	Crone és tsi. 1985
MHC II	antigén bemutatás	Humphrey és tsi. 1976	Cullen és tsi. 1974	Lunney és tsi. 1978	Usinger és tsi. 1977	Ewert és tsi. 1984

2.3. CD3ε fehérje szerkezete és feladata

A szervezet számára veszélyt jelentő anyagok felismerésére az adaptív immunrendszerrel rendelkező állatokban két egymással összefüggő rendszer is kialakult. Amíg a B-limfociták az antigének térbeli szerkezetét ismerik fel, addig a T-sejtek az antigénből származó, az antigén feldolgozás (antigen processing) során létrejövő, MHC fehérjékhez kapcsolódó peptidekhez kötődnek, végső soron tehát a fehérje aminosav-sorrendjét ismerik fel. Az antigén felismeréséért mindkét féle sejtben hasonló módon átrendeződő, immunglobulin szupercsaládba tartozó antigén receptorok felelősek. A B-sejtek esetében ez a sejt felszíni immunglobulin receptor (B sejt receptor), míg a T-limfocitákban a T-sejt receptor (TCR).

Az antigénből származó peptidekhez közvetlenül kötődő klonotipikus TCR két egymással homológ átrendeződő lánc (TCR $\alpha(\gamma)$ és $\beta(\delta)$) heterodimerje. Mivel a TCR mindkét láncának csak elhanyagolható méretű a citoplazmatikus szakasza, korán világossá vált, hogy az antigén-felismerés jelét a sejtbe más fehérjék közvetítik. Koprecipitációs kísérletekből kiderült, hogy a TCR dimer egy olyan több alegységből álló fehérjestruktúra, a TCR komplex részeként található a membránban, amelynek részei nem klonotipikus transzmembrán fehérjék is (Oettgen és tsi. 1986): a kiterjedt extracelluláris doménnel rendelkező CD3 fehérjecsald tagjai (CD3 γ , CD3 δ és CD3 ϵ láncok), illetve a csak nagyon rövid sejtben kívüli résszel rendelkező - ezért az ellenük irányuló sejt felszíni epitópokat felismerő ellenanyagok hiányában a CD nevezéktan alapján általában el nem nevezett - ζ lánc és ennek alternatív splicing-gal létrejövő formái (Clevers és tsi. 1988). Bár a T-sejt receptorkomplex pontos felépítése még ismeretlen, feltételezik, hogy két egymással kapcsolódó T-sejt receptor kettőshöz egy-egy CD3 γ -CD3 ϵ és CD3 δ -CD3 ϵ , valamint két $\zeta\zeta$ dimer kapcsolódik olyan módon, hogy a láncok közötti kapcsolódásért az extracelluláris és a transzmembrán régiók felelősek (Manolios és tsi. 1991).

A TCR komplex különböző tagjait már több állatfajban leírták. A halakban és a kétélűekben molekuláris biológiai módszerekkel sikerült a magasabbrendű TCR láncokkal homológ szekvenciákat izolálni. Feltételezhető, hogy a TCR-szerű fehérjék már ezekben az állatokban is receptorkomplex tagjai, amelyek a CD3 molekulákhoz hasonló nem klonotipikus láncokat is tartalmazhatnak (Rast és tsi. 1994). A madarakban és az emlősökben a TCR és a CD3 láncok fehérjeszinten is ismertek (I.

táblázat), de az egyes CD3 láncok pontos γ , δ vagy ϵ besorolása a szekvenciák ismeretének hiányában sok esetben még megoldatlan.

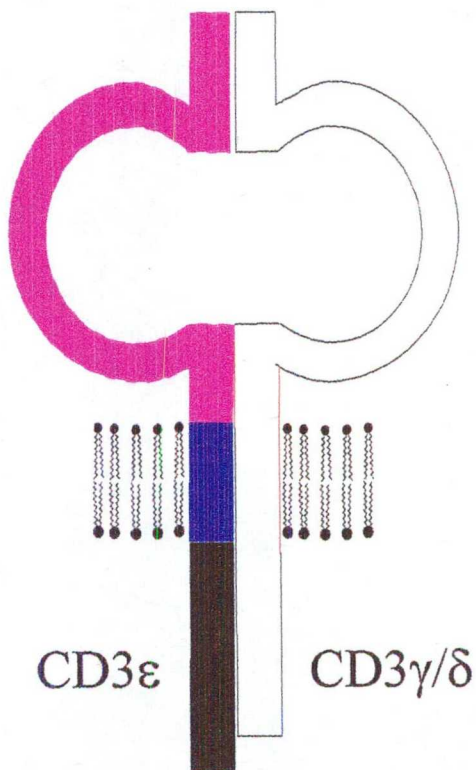
Az emberi CD3 ϵ lánc egy 20 kD-os nem glikozilálódó, az immunglobulin szupercsaládba tartozó transzmembrán fehérje (Gold és tsi. 1987). A fehérje aminosav-sorrendjét ma már több állatfajban leírták (1. ábra). A citoplazmatikus szakasz – csakúgy mint a T-sejt receptorkomplex többi nem klonotipikus fehérjelánca – tartalmaz egy ITAM motívumot (immunoreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum), amit egy D/E**Y**L/I(*)₆₈Y**L/I konszenzus szekvencia jellemez (Reth 1989, Letourneur és Klausner 1992).

Az TCR komplex antigén kötésének (vagy bizonyos sejtfelszíni epitópot felismerő CD3 ϵ ellenanyagokkal végzett stimuláció) hatására az ITAM-ban megtalálható két konzervatív tirozin reverzibilisen foszforilálódhat (Samelson és tsi. 1990, Sancho és tsi. 1993). A foszforilált forma alkalmas olyan különböző SH2 domén (Src homológ domén 2) tartalmú fehérjék kötésére, amelyek a T-sejt receptoron keresztül érkező stimuláció hatását a sejt belsejébe közvetítik. A kísérletek alapján nyilvánvaló tehát, hogy a TCR láncokhoz kapcsolódó nem-klonotipikus fehérjék a receptorkomplex jeltovábbító szerepét töltik be.

A CD3 ϵ fehérje már a T-sejt fejlődés korai szakaszában megjelenik a citoplazmában. A citoplazmatikus CD3 ϵ kifejeződés a korai T-sejteken kívül megtalálható a természetes ölősejtek egy részében is (Biassoni és tsi. 1988, Bucy és tsi. 1990), ami e két limfocita vonal szoros rokonságát bizonyítja (Rodewald és tsi. 1992). A klonotipikus TCR láncok és a nem-klonotipikus fehérjék – köztük a CD3 ϵ is – a sejtfelszínen csak egymással komplexet képezve jelenhetnek meg egy eddig még kielégítően nem jellemzett, endoplazmatikus retikulumban elhelyezkedő válogató mechanizmus működésének eredményeképpen. Részleges TCR komplexek, például endoplazmatikus chaperonokhoz (calnexin) kapcsolódó CD3 dimerek ezért legfeljebb csak különlegesen érzékeny módszerekkel mutathatók ki a sejtfelszínen (Wiest és tsi. 1995). A CD3 ϵ sejtfelszíni kifejeződésére tehát csak a TCR láncokat kódoló gének átrendeződési folyamatainak beindultával van lehetőség. A legjobban ismert TCR $\alpha\beta$ receptort hordozó T-sejtek fejlődése során először a TCR β lánc rendeződik át, amely egy invariáns preTCR α láncsal és a nem-klonotipikus láncokkal együtt alkotja az alacsony mennyiségben kifejeződő preTCR komplexet, amelyben a CD3 fehérjék

1. ábra

A CD3ε fehérje szerkezete és aminosavsorrendje a különböző fajokban



	1					60
Ember	MQSGTHWRVL	GLCLLSVGVW	GQDG----	N EEMGGITQTP	YKVSISGTTV	ILTCPQYPG-
Egér	.RWN.F.GI.	C.S..A..T-	C..D-----	A E-----NIES.	E....LDS.
Juh	..T.NL.QV.L..A.	A..D-----	T E-----N.	.E.....NS.	E....KDFE.
Sz.marhaNL..A.L..A.	A..A-----	D E-----K.	.E.....NT.	E....REFE.
Kutya	...RNL..I.A.	...EDFKASD	DLTSISPEKR	F.....E.	VV...DVF.Y
	61					120
Ember	YYVCYPRGSK	PEDANFYLYL	SEILWQHNDK	NIGGDEDDKN	IGSDEDHLSL	KEFSELEQSG
EgérTPASN	KNT.....	ENLK.EK.GQ	ELPQK-----	---HDK..V.	QD...V.D..
Juh	..Q.LATEGN	T.A.H-T...	NG.Q.KR.NE	QMK.H-----	---NEKY.L.	DQ...M.S..
Sz.marha	..Q..MTEGN	K.A.H-T...	G..H.KQ..E	QMK.-----	-----KQ.L.	EN...MDN..
Kutya	..A..ADSI.	EKS---....	DN.K.EK..N	LVE.-----	--ASNRE..QVDD..
	121					180
Ember	RARVCENCME	MDVMSVATIV	IVDICITGGL	LLLVYYWSKN	RKAKAKPVTR	GAGAGGRQRG
Egér	K....Y.V.	V.LTA..I.IL..	.MVI.....T...S.P..
Juh	K...K...	VNLE..T.I	V...V.L..STPM..P..
Sz.marha	KA...Q...	VNL.E...I	V...V.L..SSPM..P..
KutyaA..I.	VNL.A.V..I	VA...L.L..	..M.....T	...N....M.	.T...S.P..
	181			213		
Ember	QNKERPPVP	NPDYEPKRG	QRDLYSGLNQ	RRI	(Gold és tsi. 1986)	
EgérAV	(Clevers és tsi. 1988)	
Juh	..R.....GV	(Hein és tsi.1993)	
Sz.marha	..KG.....A....	.GV	(Hagens és tsi. 1996)	
KutyaK.....Q.....	.G.	(Nash és tsi. 1991)	

Jelölések: **lila**: extracelluláris régió, **kék**: transzmembrán régió, **fekete**: citoplazmatikus régió, aláhúzva: CD3ε(177-190) peptid aminosavsorrendje, **dölt betűk**: immunoreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum

Betűk: szabványos egybetűs aminosav elnevezések, - az illesztéshez szükséges szünetek (gap), . az állatfajokban állandósult aminosav
Az illesztést a GCG Pileup programjával végeztem

jeltovábbító szerepe ugyancsak bizonyított (Jacobs és tsi. 1994). A preTCR komplexen keresztül történő stimuláció jelzi a sejt számára, hogy a TCR β lánc átrendeződése sikeres, így elkezdődhet a TCR α láncok átrendeződése. Az átrendeződött TCR láncok ezután már kialakíthatják a fejezet elején részletesen leírt szerkezetű TCR komplexet, amely a T-sejtérés további lépései során egyre nagyobb mennyiségben észlelhető a sejtek felszínén.

A CD3 ϵ *in vivo* szerepét az elmúlt években többféle transzgenikus egérmodellen is tanulmányozták. A CD3 $\epsilon^{-/-}$ egérben – amelyből a CD3 ϵ gént homológ rekombinációval eltávolították – a T-sejtek fejlődése csak a legelső lépésekig zajlott le (Malissen és tsi. 1995). Ez összhangban van azzal, hogy a TCR láncok sejt felszíni kifejeződésének szükséges feltétele a klonotipikus láncok koexpressziója, és ennek hiányában a T-sejt fejlődés már a korai pro-T-sejt stádiumban megáll. Érdekes viszont, hogy több olyan egérvonalban, amiben a TCR gének átrendeződéséért (pl. RAG1 $^{-/-}$, RAG2 $^{-/-}$, SCID) vagy a komplex működéséért ($\zeta^{-/-}$, Ick $^{-/-}$) felelős géntermékek hiánya miatt a T-sejt fejlődés ugyancsak megakad a pro-T-sejt pre-T-sejt átalakulás határán, az anti-CD3 ϵ monoklonális ellenanyaggal történő stimuláció *in vivo* vagy *ex vivo* (fetális tímusz kultúrák) képes a T-sejtek fejlődését ezen a ponton túllendíteni (Levelt és tsi. 1993). A nagy kópiaszámú CD3 ϵ gént hordozó transzgenikus egérben mind a T limfociták, mind a természetes ölüsejtek fejlődése gátolt (Wang és tsi. 1994). A CD3 $\epsilon^{-/-}$ egérben azonban a természetes ölüsejtek kifejlődéséhez és funkciójához a CD3 ϵ fehérje kifejeződése nem szükséges, ami arra utal, hogy a természetes ölüsejtekben kifejeződő CD3 ϵ szerepe nem alapvető (Renard és tsi. 1995).

2.4. A CD43 fehérje szerkezete és feladata

Az 1970-es évek végén végzett lektinkötési kísérletekből ismertté vált, hogy a vörsejtek membránfehérjéi között van egy nagy mennyiségben kifejeződő 115-135 kD molekulású glikoprotein, amelynek elektroforetikus mobilitása a sziálsav molekulákat eltávolító neuraminidáz kezelés hatására erősen lecsökken (Axelsson és tsi. 1978). Ezt a fehérjét egymástól függetlenül több laboratóriumban is leírták: patkányban W3/13 antigén (Brown és tsi. 1981), egérben és emberben large sialoglikoprotein (Axelsson és tsi. 1985), gpL115 (Remold O'Donnell és tsi. 1986), leukosialin (Carlsson és tsi. 1986) és sialophorin (Mentzer és tsi. 1987) néven. Később kiderült, hogy az

“International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens” rendezvény keretében meghatározott 43. ellenanyagcsoport is ugyanezt a molekulát ismeri fel, így azóta a CD43 elnevezés használatos (Borche és tsi. 1987).

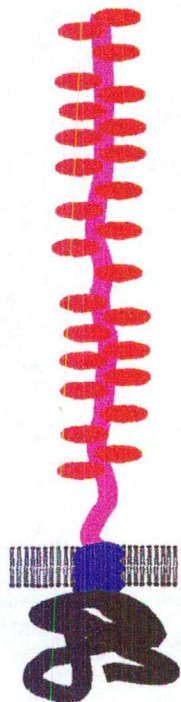
A CD43 molekula megtalálható a vér szinte valamennyi sejtés elemén, illetve az ilyen eredetű sejtvonalakon (Brown és tsi. 1981, Axelsson és tsi. 1985). A fehérjének két típusa van, a 135 kD körüli molekulásúlyú forma a B-limfociták egy részén, a T-limfocitákon és a monocitákon található, míg a 115 kD körüli forma a granulocitákon és a vérlemezkéken mutatható ki. Az eltérő mobilitást az eltérő mértékű glikoziláltság eredményezi (Remold-O'Donell és tsi. 1987).

A CD43 glikoprotein egy kb. 400 aminosavból álló membránfehérje (Killeen és tsi. 1987, Pallant és tsi. 1989). A kb. 250 aminosav hosszúságú sejten kívüli rész más fehérjétől eltérően igen nagy számban tartalmaz szerint és treonint, amelyekhez szialsav tartalmú oligoszacharid oldalláncok kapcsolódnak O-glikozidos kötéssel. A fajok között a sejten kívüli rész nem mutat magas fokú állandósultságot, a magas szerin és treonin tartalom azonban minden eddig vizsgált fajban megtalálható. A transzmembrán régió, más transzmembrán fehérjékhez hasonlóan kb. 25, zömmel hidrofób aminosavból áll. A kb. 130 aminosavból álló citoplazmatikus rész, amely a fehérje fejlődéstani szempontból legállandósultabb része, valószínűleg bonyolult harmadlagos szerkezetet vesz fel (Cyster és tsi. 1990) (2. ábra). A CD43 egyetlen szakasza sem mutat felismerhető mértékű homológiát más ismert fehérjével, ami a molekula sajátos szerepére utalhat. A fehérjét kódoló gén szerkezete az emberben ismert, érdekessége, hogy a fehérje csak két exonban kódolt, és a teljes transzlálódó szakasz a második exonban helyezkedik el (Shelley és tsi. 1990).

A CD43-at felismerő mEa-okkal végzett stimulációt jellegzetes változások kísérik. Megnö a sejtek általános adheziós képessége, a sejtek jobban kötődnek a vírusokhoz (pl. Human Immunodeficiency Virus), a mátrix-fehérjékhez (pl. fibronectin) illetve más hasonló (homotipikus aggregáció) vagy eltérő sejtekhez (heterotipikus aggregáció) (Axelsson és tsi. 1988, Nong és tsi. 1989). Az adhéziót azonban egyik esetben sem a CD43 fehérje közvetíti, hanem más adhéziós struktúrák. Az irodalomban csak elvétve található arra utalás, hogy a CD43 ellenanyagok önmagukban sejtaktivációt okoznak (Wong és tsi. 1990), viszont képesek más önmagukban is hatékony stimulusok hatását felerősíteni. Ilyen kostimuláció mutatható ki egyebek között a T-limfocitákban a T-sejt receptoron keresztül történő sejtaktiválásnál

2. ábra

A CD43 fehérje szerkezete és aminosavsorrendje a különböző fajokban

 O-glikoziláció


	1								70
Ember	DALGST-TAV	Q-TPTSGEPL	VSTSEPLSSK	MYTTSITSDP	KADST--GDQ	TSALP-PSTS	INEGSPLW-T		
Egér	.S.QR...ML	PS..HITA.S	T.EAQNASPS	VSVG.G.V.S	.ETISPW.QT	.IPVSLTPLE	TT.L.SLE..		
Patkány	EN.PN.M.ML	PF..NSES.S	T.EALSTY.S	IATVPV.E..	.ESISPW.QT	.APASSIPLG	TP.L.SFFF.		
	71								140
Ember	SIGASTGSPL	PEPTYQEVS	IKMS-SVPQE	TPHATSHPAV	PITANSLGSH	TVTGGTITTN	SPETSSRTSG		
Egér	.A...MST.VAS....	SKT..ALLP.	PSNVA.D.P.	TAANPVTGDP	AANPVTDG.A	ASTSI.KGTS		
Patkány	.A...GNT.V	..L..S....	TEA.LVFLPK	SSGVA.D.P.	TI.NPATS.A	VAS-----	TSLETFKGTS		
	141								210
Ember	APVTTAASSL	ETSRGTSGPP	LTMATVSLET	SKGTSGPPVT	MATDSLETST	GTTGPPVTMT	TGSLEPSSGA		
Egér	..PT.VTTS-	--SNE....S	VATTVS.K--	-----	T..G..GP.S	EMH.LPA.TA	.S.V.S..V.		
Patkány	..PV.VTSS-	---TM....F	VATTVS.E--	-----	...G..GP.K	ETH.LSA.IA	.S.G.S..V.		
	211								280
Ember	SGPQVSSVKL	STMMSPTTST	NASTVPRNP	DENSRGMLPV	AVLVALLAVL	ALVALLLLWR	RRQKRRTGAL		
Egér	R.TS.S.R.-	----TS....	QDP-ITTRS.	SQE.S...L.	PM.I..VV.I	V.....	Q.....		
Patkány	G.TP.F.T.-	----IS....	PNP-ITTVP.	RPG.S...L.	SM.I..TV.L	V.....	Q.....		
	281								350
Ember	VLSRGGKRNQ	VVDWAGPAQ	VPEEGAVTVT	VGGSGGDKGS	GFPDGEQSSR	RRPTLTTFFG	RRKSRQGSIA		
Egér	T..G.....R	..D.E.T.TS	--.A..N...	EVLET...GQSV		
Patkány	T.....	T.....R	..D.E.T.AS	--...N.S.	.APETD..GQSV.		
	351				396				
Ember	MEELKSGSGP	SLKGEEELPV	ASEDGAVDAP	APDEPEGGDG	AAP---	(Shelley és tsi. 1989)			
Egér	L....P....	N.....	G...E..ET.	TS.G.QAK.E	...QSL	(Pallant és tsi. 1989)			
Patkány	L....P.T..	N.....	G...E..ET.	TS.G.QAK..	...QSL	(Killeen és tsi. 1987)			

Jelölések: **lila**: extracelluláris régió, **kék**: transzmembrán régió, **fekete**: citoplazmatikus régió, aláhúzva: CD43(352-372) peptid szekvenciája

Betűk: szabványos egybetűs aminosav elnevezések, - az illesztéshez szükséges szünetek (gap), . az állatfajokban állandósult aminosav

Az illesztést a GCG Pileup programjával végeztem.

(Axelsson és tsi. 1988) vagy a neutrofil granulocitákban a lipopoliszacharidra adott oxidatív metabolit termelésnél.

A CD43 szerepe mindezek ellenére még alig ismert. Az előző kísérleteket eleinte úgy értelmezték, hogy a CD43 molekula egy olyan koreceptor lehet, amely egy külső ligand hatására továbbít jeleket a sejt felé. Az elmúlt években nagy erővel kutatták a feltételezett ligandot. Egy csoport kimutatta, hogy a CD43 molekula a CD54 fehérjét köti, bár ezt az eredményt azóta nem sikerült megerősíteni (Rosenstein és tsi. 1991). Mivel a CD43 fehérje a szelektinekhez hasonlóan glikozilált, felvetődött annak a lehetősége is, hogy a molekula szelektinként vagy szelektin receptorként viselkedik, de ez a feltevés is tévesnek bizonyult (Shimizu és Shaw 1993). A CD43 ellenanyagokkal végzett kísérletek a glikoprotein adhéziót negatívan moduláló szerepére is utalhatnak. A fehérje biokémiai sajátosságai ezzel a funkcióval jól összeegyeztethetők, hiszen a CD43 a többszörösen szializált glikozid oldalláncok miatt egy erős negatív töltéssel rendelkező olyan fehérje, amely az immun-elektromikroszkópiai vizsgálatok szerint hosszú rúdszerű szerkezetet vesz fel, így messze a többi membránfehérje fölé magasodik (Cyster és tsi. 1991). Két szomszédos sejt összetapadását ez a struktúra hatékonyan megakadályozhatja (Ardman és tsi. 1992). Erre a vérben óriási szükség is van, hiszen ha a vér alakos elemei összetapadhatnának, könnyen olyan aggregátumok keletkeznének, amelyek a kapillárisok eltömődéséhez vezetnének. A CD43 molekula azonban nem csak a vörsejtek aggregációját gátolja a modell szerint, hanem valószínűleg az érfalhoz történő adhéziót is. Az anti-adhéziós modell tükrében a CD43 ellenanyagok kostimuláló hatása úgy is értelmezhető, hogy az ellenanyagok a CD43 molekulákat keresztkötik (Cyster és Williams 1992), és ezzel párhuzamosan az eddig takarásban lévő membránstruktúrák, köztük a különböző aktivációért felelős receptorok, a ligandjaik számára hozzáférhetővé válnak.

A CD43^{-/-} egérben, amelyből a CD43 gén egy szakaszát homológ rekombinációval eltávolították, a főbb fehérvérsejt populációk jelen vannak, ami arra utal, hogy ennek a fehérjének nincsen alapvető szerepe a hematopoetikus sejtek fejlődésében. A CD43^{-/-} egér fehérvérsejtjei olyan tulajdonságokat mutatnak, mint a CD43 ellenanyagokkal kezelt normál egerből származó fehérvérsejtek: megnő az adhéziós képességük és könnyebben aktiválhatók. A knock out egér modell ezért az anti-adhéziós modellt támasztja alá (Manjunath és tsi. 1995).

2.5. Az immunrendszer elemeit felismerő immunreagenseken alapuló diagnosztikai módszerek

Az immundiagnosztikai módszerek célja a sejtszöveti fehérjék antigén-ellenanyag kölcsönhatáson alapuló azonosítása és láthatóvá tétele különböző riportertermolekulák (fluoreszcens vegyületek, színes enzimszubsztrátok vagy kolloidális arany) segítségével. A patológiai diagnosztikában a fehérvérsejteket felismerő immunreagenseket két egymást jól kiegészítő területen használják fel.

Az *immuncitokémiai módszerek* során tisztított sejtpopulációkat jellemzünk. A tisztítás során bizonyos sejtpopulációk szelektíven feldúsulhatnak vagy kiritkulhatnak, elsősorban akkor, ha a sejteket kompakt szövetekből kell izolálni (Poppema és tsi. 1982). Az immuncitokémiai módszereket ezért elsősorban a vérben található sejtek jellemzésére használják. Az immuncitokémiai módszerek legkorszerűbb és legkiterjedtebben használt formája az áramlási citofluorimetria. Ez a módszer lehetővé teszi nagy számú sejt egyedi immunfenotípusának meghatározását és ezek statisztikai kiértékelését, így a vizsgált markert hordozó sejtek aránya és a pozitív sejteken kifejeződő markerek mennyisége is mérhető (Poncelot és Caryon 1985). A hagyományos immuncitokémiai módszerekkel szemben a citofluorimetria legnagyobb előnye tehát a kvantitatívitás. A citofluorimetriához a sejteket nem szükséges rögzíteni, így a tisztított sejteken különböző *in vitro* vizsgálatok is elvégezhetők, ami a diagnózishoz fontos adalékul szolgálhat.

Az *immunhisztokémiai módszerek* során a sejtszöveti fehérjéket *in situ*, azaz a szöveti környezetükben mutatjuk ki. Az immunhisztokémiai jelölés ötvözhető több hagyományos szövet- és sejtfestési eljárással is, ezért a sejtek morfológiája is jobban tanulmányozható, ami a diagnózis felállítását nagy mértékben megkönnyíti. Ez főleg a citofluorimetriás módszerrel összehasonlítva jelentős előny, ahol a sejtek alaktani sajátosságai csak korlátozott mértékben vizsgálhatók. Az immunhisztokémiai eljárások további előnye az, hogy a szövetekben kis mennyiségben található sejtek is nagy biztonsággal kimutathatók, míg az immuncitokémiai módszerek esetében az 1-5 %-nál kisebb sejtpopulációk kimutatása sokszor nem lehetséges.

Az immuncitokémiai és immunhisztokémiai módszerek sarkalatos pontja a rögzítés (fixálás), ami megakadályozza a sejtek és szövetek szétesését valamint az antigének szövetekből történő kioldódását a festési folyamat alatt. A leggyakrabban

alkalmazott rögzítőszer működési elve alapulhat a sejtekben található makromolekulák kicsapásán. Az ilyen rögzítőszer tartalmazhatnak szerves oldószereket (pl. acetont), savakat (pl. Bouin-féle rögzítő oldat) vagy nehézfém sókat (pl. B5 rögzítő oldat). A rögzítőszer másik csoportja (pl. formaldehid, glutáraldehid) a makromolekulákat keresztköti. A rögzítés azonban nemcsak a rögzítőszerrel függ, hanem a rögzítés pH és ionerősség viszonyaitól, időtartamától és hőmérsékletétől (DeLellis és tsi. 1988), valamint a rögzítendő sejt vagy szövet tulajdonságaitól is (Van Leeuwen és tsi. 1983). A rögzítéskor a fehérje epitópok módosulhatnak, az alkalmazott rögzítési módszer kiválasztása tehát mindig optimalizálás. Arra törekszünk, hogy a morfológia lehető legjobb megőrzése mellett az immunreaktivitás is minél érintetlenebb maradjon.

Az immuncitokémiai és immunhisztokémiai módszerek két nagy csoportra oszthatók. A *natív technikák* legnagyobb előnye, hogy a minták immunreaktivitása az esetek többségében az alkalmazott enyhe rögzítőszer miatt nem csökken (Robbins 1987). Az ilyen minták kezelése (pl. fagyasztott szövetek metszése) és tárolása (-80°C-on) nehézkes, a sejtek és szövetek alaktani sajátosságai pedig csak korlátozott mértékben őrződnek meg. Az *archivált technikák* során a szövetek rögzítése után a mintákat olyan anyagokba ágyazzák be, amely lehetővé teszi a szövetek hosszabb ideig (akár évtizedekig) történő tárolását. Az ilyen minták vizsgálatával mód nyílik a beteg kórfejlődésének visszatekintő nyomon követésére, illetve a különböző kóresetek összehasonlító elemzésére.

Mivel a beágyazás folyamata során a minták a szöveteket könnyen tönkretevő hatásoknak vannak kitéve, a beágyazás előtt erős rögzítésre van szükség. Az archiválandó mintákat a mindennapi gyakorlatban neutrális pufferelt formalinnal (NPF) fixálják és paraffinba ágyazzák (Fox és tsi. 1985). A NPF hatóanyaga, a formaldehid rögzítő hatását úgy éri el, hogy a fehérje primer aminocsoportjaival (leggyakrabban a lizinekkal) reakcióba lép és a fehérjéket keresztköti (Kitamoto és Maeda 1980). A beágyazás során alkalmazott kezelések, a magas hőmérséklet és a különböző szerves oldószerek pedig a fehérjéket denaturálják. Ezért – bár az NPF-nal fixált paraffinba ágyazott szövetek morfológiai tulajdonságai kitűnőek – az immunreaktivitás kevés kivételtől eltekintve csökken, sokszor az ellenanyagok az antigént a rögzítés és beágyazás után fel sem ismerik.

Az immunreaktivitás sokszor *epitóp visszanyerési módszerekkel* részlegesen visszaállítható. Amennyiben az ellenanyag a formaldehid által létrehozott keresztkötések miatt nem tud hozzáférni az antigénhez, limitált proteolitikus emésztést alkalmazhatunk abban a reményben, hogy az a keresztkötött felszíni struktúrák lehasítása után az addig rejtett epitópok hozzáférhetővé válnak. (Brozman 1978, Finley és tsi. 1982). Ha az epitópot az immunreagens azért nem ismeri fel, mert az epitópot hordozó fehérje denaturálódott, renaturációs technikákkal kísérletezhetünk. Ennek legismertebb formája a nedves hővel történő kezelés, amikor a metszeteket felforraljuk (denaturáljuk) mikrohullámú sütőben (Shi és tsi. 1991, Shi és tsi. 1993, Cattoretti és tsi. 1993) vagy kuktában (Norton és tsi. 1994) és hagyjuk szobahőmérsékletre visszahűlni (renaturáció).

2.6. Az immunrendszer elemeit felismerő immunreagensok jelentősége a humán diagnosztikában

A fehérvérsejt-antigéneket felismerő ellenanyagokat nem csak és ma már nem is elsősorban az elméleti kutatásokban használják, hanem ezek a reagensok a humán patológiai diagnosztika nélkülözhetetlen eszközeivé váltak. Az ilyen immunreagensok diagnosztikai alkalmazása azon alapul, hogy a különböző kórképekben az immunrendszer sejtjeinek fenotípusa, mennyisége és eloszlása a szervezetben jellegzetes változásokat mutat. Ezen tulajdonságok nyomon követésével a patológiás elváltozást okozó tényezőkre következtetni lehet.

Az emberi kórképek jelentős részéért felelős kórokozók zöme kiterjedt sejt- és szövetpusztulást okoz a fertőzés területén. Ezen kórokozók elleni védekezés egyik legalapvetőbb eszköze a gyulladáshoz vezető reakció, amelynek során az adott kórokozó faj elleni immunválaszban szerepet játszó fehérvérsejtek a fertőzést okozó patogéneket elpusztítandó a megtámadott szövetekbe, szervekbe gyűlnek. A gyulladáshoz vezető területet besűrűsítő fehérvérsejtek minőségi és mennyiségi jellemzői utalhatnak a kórokozókra, így ezen sejtek szerológiai tulajdonságainak meghatározása diagnosztikai értékű lehet.

Az immunrendszer elemeit felismerő immunreagensokat elsősorban mégis az immunrendszert érintő kórképek felismerésében alkalmazzák kiterjedten. Az *immunhiányos állapotokban* az immunrendszer bizonyos elemei vagy funkciói öröklött vagy szerzett módon hiányoznak. Az immunrendszer hiányzó elemeinek kimutatása elképzelhetetlen a megfelelő immunsejteket felismerő reagensok nélkül. A szerzett

immunhiányos állapotok sokszor olyankor alakulnak ki, amikor maga a fehérvérsejt a kórokozó célsejtje. Ez leggyakrabban a megtámadott sejtek pusztulásához és/vagy aktivitásának csökkenéséhez vezethet (pl. AIDS), néhány kórképben viszont a fehérvérsejtek osztódása válik szabályozatlanná (pl. Epstein-Barr vírus-fertőzés). Az ilyen, a fehérvérsejtek egy nagyobb csoportjára kiterjedő (poliklonális) *limfoproliferáció* és az immunrendszer sejtjeit érintő, egy vagy néhány valóban transzformálódott sejt utódaiból létrejövő (mono- és oligoklonális) *tumor* sokszor nagyon hasonló tüneteket okozhat. A fehérvérsejt-antigéneket felismerő immunreagensok szerepe e két merőben eltérő kezelést igénylő állapot elkülönítésében ma már nélkülözhetetlen. Sokszor a daganatos sejtek változatos alaktani sajátosságai miatt már a hematopoetikus eredet is csak fehérvérsejt-specifikus markerek (pl. a minden fehérvérsejten kifejeződő CD45 vagy leukocita közös antigén) segítségével állapítható meg (Kurtin és Pinkus 1985). Ráadásul a hagyományos, alaktani sajátságokon és enzimexpresszió alapuló módszerekkel megkülönböztethetetlen, mégis eltérő immunfenotípusú sejtekből álló daganatok sokszor teljesen más jellegű klinikai kezelést igényelnek (Palutke és tsi. 1986, Swanson és tsi. 1987). A hematopoetikus eredetű daganatos betegségekről, a leukémiákról és limfómákról eleinte azt gondolták, hogy azok olyan sejtvonalak, amelyek a fehérvérsejtérés egy meghatározott szakaszában megakadtak (Foon és tsi. 1982). Számos esetben kiderült azonban, hogy a daganatos sejtek fenotípusa sokszor egyetlen limfocita fejlődési állapotnak megfelelő immunfenotípussal sem mutat rokonságot (Hsu 1988). Ma ezért az a legelfogadottabb nézet, hogy a transzformálódott sejtvonalak csak a szabályozott osztódás képességét veszítették el, de a differenciálódási program bizonyos elemeit nem (Mason 1987). Éppen ezért csak a diagnosztikus szempontból jelentős különböző markerek meglétének vagy hiányának meghatározása, azaz a leukémiák és a limfómák pontos szerológiai jellemzése után állítható fel megfelelő diagnózis (Spieler és tsi. 1986). Az *autoimmun kórképekben* az immunrendszer szabályozása sérül olyan módon, hogy nem csak a veszélyes anyagok ellen képződik immunválasz, hanem a szervezet saját struktúrái ellen is. Mivel egyre több emberi betegségben ismerik fel az autoimmun összetevő jelentőségét, feltételezhető, hogy a jövőben a reagensok felhasználása ezen a területen is nő.

3. Célkitűzések

Az emberi fehérvérsejt-antigéneket felismerő immunreagensek alkalmazásán alapuló immuncitokémiai és immunhisztokémiai módszereknek a modern kórélettan számos területén alapvető szerepe van a diagnózis felállításában. Az elmúlt időkben végzett kutatások eredményeként leírtak ugyan számos olyan monoklonális ellenanyagot, amely alkalmas egy-egy állatorvosi szempontból kiemelkedő fontosságú faj különböző fehérvérsejt-csoportjainak az azonosítására, a rutindiagnosztikában azonban ezek a reagensek sokszor csak korlátozott mértékben használhatók fel.

A kifejezetten állatorvosi rutindiagnosztikai célra szánt immunreagensek kifejlesztésénél két sajátosságot kell figyelembe vennünk. A kórházban lévő, súlyosan beteg emberből származó szöveteket (biopsziák vagy autopsziák) helyben vizsgálhatják, ami lehetővé teszi a natív módszerek alkalmazását. Ezzel szemben a beteg állatok "állatkórházakba" történő összegyűjtése járványtani szempontból kifejezetten kedvezőtlen lenne. A beteg állatokból származó diagnosztizálandó mintákat a kóros helyszínen gyűjtik be, azok kiértékelésére azonban csak a megfelelően felszerelt diagnosztikai laboratóriumokban van lehetőség. Az állatorvosi gyakorlatban a mintavétel és a diagnózis tehát rendszerint térben és időben is elkülönül egymástól, ami szükségessé teszi a szervek és szövetek rögzítését. *Az állatorvosi gyakorlatban tehát a rögzített szövettani anyagoknak kitüntetett jelentősége van.* A leggyakrabban alkalmazott rögzítési eljárások viszont erősen csökkentik a szövetek immunreaktivitását. *Az állatorvosi gyakorlatban nagyon sok faj előfordul.* Az állatorvosi munkát nagy mértékben megkönnyítik azok a reagensek, amelyek az állatfajok szélesebb körében alkalmazhatók.

Kísérleteinkben ezért olyan immunreagensek előállítására és/vagy jellemzésére törekedtünk, amelyek a törzsfajlás során állandósult olyan epitópokat ismernek fel, amelyek a rögzítés során nem szenvednek visszafordíthatatlan változást. Az ilyen ellenanyagok ugyanis lehetővé teszik a rögzített szövetek vizsgálatát az állatfajok szélesebb körében. Több különböző megközelítéssel előállított állati fehérvérsejt-antigéneket felismerő immunreagens-típus között kíséreltünk meg ennek a kettős követelményrendszernek eleget tevő immunreagenseket találni.

4. Felhasznált anyagok és módszerek

4.1. A felhasznált vegyszerek, ellenanyagok, plazmidok, sejtek, szövetek és kísérleti állatok eredete

Reagensok

A kísérletekhez az elérhető legmagasabb tisztaságú vegyszereket alkalmaztuk, amelyek leggyakrabban a Reanaltól származtak. Amennyiben a reagens más gyártótól származott, azok eredetét zárójelben feltüntettem.

Ellenanyagok

Monoklonális ellenanyagok

AFP26 (Monostori és tsi. 1984)	humán α -fetoprotein	IgG1
OKT3 (Ortho)	humán sejtfelszíni CD3 ϵ	IgG2a
MA5E (Andó és tsi. 1984)	humán sejtfelszíni CD14	IgG1
HD37 (DAKO)	humán sejtfelszíni CD19	IgG1
T2/53 (Andó és tsi. 1995)	humán sejtfelszíni CD43	IgG1

illetve a "Third International Workshop on Ruminant Leukocyte Antigens" által rendelkezésre bocsátott kérődző állatok fehérvérsejt-antigénjeit felismerő ellenanyagok

Nyúlszérumok

chromogranin α (DAKO)	chromogranin α C-terminális
p.aCD3 ϵ (177-190) (DAKO)	lásd. 5.2. fejezet
aGST-rhe	GST-rhe fúziós fehérjét felismerő szérum
p.aE.coli-GST	lásd 5.4. fejezet
p.aCD43cp	lásd 5.4. fejezet

Plazmidok

pBC-SK + (Stratagen)

pHF1 a A teljes CD43 gént tartalmazó genomikus klón Hind III-Hind III helyen pBluescript vektorba klónozva (Kudo és tsi. 1991).

pGEX-KN (Hakes és Dixon 1992)

pTS1/14.5 (Szlanka T.) A pGEX-KN olyan változata, amely a pGEX-KN-PTP_{U232} plazmidhoz (Hakes és Dixon 1992) hasonlóan tartalmazza a thrombin hasító helyet azzal a különbséggel, hogy a thrombin felismerő hely nukleotid szekvenciája egyúttal Sac II restrikciós endonukleáz helyet is tartalmaz. A plazmid inzertként a dolgozatom szempontjából irreleváns szekvenciát tartalmaz Sac II-EcoRI helyre klónozva.



Baktériumtörzsek

Escherichia coli Sure (Stratagen): kék-fehér színszelekciót lehetővé tevő, igen könnyen transzformálható törzs, amelyet az általános molekuláris biológiai munkában használtunk fel.

Escherichia coli BL21 (Pharmacia): ompT (bakteriális proteáz) hiányos törzs, amelyet a fúziós fehérje kifejeztetésére használtunk fel.

Sejtvonalak

T-sejt jellegű sejtvonalak: CEM, HPB-ALL, Hut-78, Jurkat, MolT4

B-sejt jellegű sejtvonalak: Daudi, P3HR1, Raji, Ramos

eritromieloid jellegű sejtvonalak: K562

mieloid jellegű sejtvonalak: HL60, U937

Szervek, szövetek és szövettani blokkok eredete

Az emberi vér egészséges véradóktól származott (SZOTE Vértranszfúziós Állomás), a felhasznált emberi lépet és nyirokcsomót a SZOTE Patológia Intézetében szereztük be. Az egereket (Balb/c) az MTA SZBK állatháza biztosította számunkra. A szerveket az egér cervikális diszlokációja után boncolással távolítottuk el. A szarvasmarha- és sertésvért illetve szerveket a Pick Rt.-től szereztük be. A házi tyúkot, házi kacsát és házi pulykát a piacon vásároltuk, és az elvéreztetés után a kísérletekhez szükséges szerveket boncolással távolítottuk el. A csimpánzból és házi bivalyból származó nyirokcsomókat valamint a tevévért az ország különböző állatkertjei bocsátották rendelkezésünkre. A védett nagy pólingot (*Numenius arquata*), fűрге gyíkot (*Lacerta agilis*) és ásóbékát (*Pelobates fuscus*) frissen elhullva találtuk, és a kísérleteinkhez szükséges szerveket boncolással távolítottuk el.

Az 1986 és 1993 között gyűjtött, különböző állati kórképekből származó formaldehiddel rögzített paraffinba ágyazott szövettani blokkokat az Országos Állategészségügyi Intézet bocsátotta rendelkezésünkre. A szövettani blokkok az alábbi fajokból származtak: ponty, házi tyúk, házi pulyka, házi kacska, kutya, macska, nyérc, házi nyúl, szarvasmarha, juh, kecske, sertés, ló és házi patkány.

Kísérleti állatok

A fiatal házi nyulakat a piacon vásároltuk, és az immunizálás ideje alatt az MTA SZBK Állatházában tartottuk.

4.2. Mikrobiológiai módszerek

Baktériumtörzsek tenyésztése

A baktériumtörzseket megfelelő szelekciós körülményeket biztosító LB (vagy SOB) tápoldatban és táptalajon tenyésztettük és tartottuk fenn a hagyományos mikrobiológiai technikákat alkalmazva.

Tápoldatok:	1 l LB tápoldatra	Bakto-tripton (Difco) 10 g Élesztő kivonat (Difco) 5 g NaCl 5 g pH=7.0-ra NaOH-dal
	1 l SOB tápoldatra	Bakto-tripton (Difco) 20 g Élesztő kivonat (Difco) 5 g NaCl 10 mM KCl 2.5 mM MgCl ₂ (Merck) 10 mM MgSO ₄ (Merck) 10 mM

A lemezek öntésénél az alábbiakhoz még 20 g agar-agart (Difco) adagoltunk.

Szelekciós körülmények	Ampicillin (Sigma) 25 µg/ml Klóramfenikol (Sigma) 30 µg/ml X-Gal (Sigma) 25 µg/ml IPTG (Sigma) 0.1-1 mM
------------------------	--

Kompetens sejt készítése az Escherichia coli BL21 törzsből

Egy ml éjszakán át növesztett BL21 baktériumtenyészetet LB tápoldatban százszorosára hígítottunk, majd a baktériumkultúrát $OD_{600}=0.4-0.5$ -ig növesztettük 37°C-on. Az összegyűjtött tenyészetet 33 ml 100 mM CaCl₂ oldatban szuszpendálva harminc percig 0°C-on tartottuk. Az újból összegyűjtött sejteket 4 ml 100 mM CaCl₂-ot és 12 % (v/v) glicerint tartalmazó oldatban vettük fel és éjszakán át jégen inkubáltuk. Az így kompetenssé tett sejteket 100-200 µl-es részletekben lefagyasztottuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A sejtek kompetenciáját a baktériumok egy magas kópiaszámú plazmiddal (pl. pBC-SK) történő transzformálása után kinövő telepek száma alapján határoztuk meg. Tapasztalataink szerint a BL21 törzsből készített sejtek kompetenciája a 10⁴ telep/µg plazmid értéket sohasem haladta meg.

Az *Escherichia coli* BL21 törzs transzformálása

Az 1-5 µg plazmival összekevert 100-200 µl kompetens sejtet harminc percig jégen tartottuk, majd egy-két perces 42°C-os hőshock kezelés után a sejtszuszpenziót ismét öt-tíz percre jégre raktuk. Ezt követően a sejtekhez 1.5 ml LB tápoldatot adva a tenyészetet két óráig rázattuk 37°C-on, majd a baktériumokat megfelelő hígításokban a megfelelő szelekciós körülményeket biztosító LB táptalajra szélesztettük. A transzformáns baktériumtelepek tizenhat-huszonnégy óra alatt nőttek ki 37°C-on.

Kompetens sejt készítése az *Escherichia coli* Sure törzsből (Inoue és tsi. 1990)

Egy ml éjszakán át növesztett Sure baktériumtenyészetet LB tápoldatban százszorosára hígítottunk, és a baktériumkultúrát $OD_{600}=0.5-0.6$ -ig növesztettük 18°C-on. Az összegyűjtött tenyészetet 33 ml TB pufferben szuszpendálva tíz percig 0°C-on tartottuk. Az újból összegyűjtött sejteket 10 ml 100 mM $CaCl_2$ -ot és 12 % (v/v) glicerint tartalmazó oldatban vettük fel és tíz percig jégen inkubáltuk. Az így kompetenssé tett sejteket 100-200 µl-es részletekben lefagyasztottuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

A sejtek kompetenciáját az előzőekben ismertetett módon meghatároztuk. Tapasztalataink szerint a Sure törzsből készített sejtek kompetenciája általában elérte a 10^7 telep/µg plazmid értéket.

TB puffer:	PIPES (Calbiochem) 10 mM
	MnCl ₂ 55 mM
	CaCl ₂ 15 mM
	KCl 250 mM

Az *Escherichia coli* Sure törzs transzformálása

Az 0.05-0.5 µg plazmival összekevert 100-200 µl kompetens sejtet harminc percig jégen tartottuk, majd fél perces 42°C-os hőshock kezelés után a sejtszuszpenziót jégen hagytuk 0°C-ra hűlni. Ezt követően a sejtekhez 0.8 ml 20 mM glükózt (Merck) tartalmazó SOB tápoldatot adva a tenyészetet két óráig rázattuk 37°C-on, majd a baktériumokat megfelelő hígításokban a megfelelő szelekciós körülményeket biztosító SOB táptalajra szélesztettük. A transzformáns baktériumtelepek tizenhat-huszonnégy óra alatt nőttek ki 37°C-on.

4.3. Molekuláris biológiai módszerek

Plazmid tisztítás *Escherichia coli* Sure törzsből (Sun és tsi. 1994)

A 2-3 ml éjszakán át megfelelő szelekciós körülményeket biztosító LB tápoldatban felnövelt baktériumtenyészetet összegyűjtöttük és felfuszpendáltuk 100 µl 50 mM glükózt (Merck), 10 mM EDTA-t és 25 mM Tris/HCl (pH=8.0) tartalmazó oldatban. Három-öt perc múlva a baktérium-szuszpenzióhoz 200 µl szobahőmérsékletű 0.2 M NaOH-ot és 1 % (w/v) SDS-t tartalmazó oldatot adtunk, és a mintákat öt percre jégre tettük. A lizált baktériumokhoz 150 µl 3 M K-acetátot és 2 M ecetsavat tartalmazó oldatot adtunk, és a baktérium-lizátum kromoszómális DNS tartalmát 0°C-on tíz percig hagytuk kicsapódni. A felülúszó DNS tartalmát 0°C-on öt-tíz percig 2.5 térfogat tömény etanollal kicsaptuk. Az centrifugálással összegyűjtött csapadékot 400 µl 100 mM-os Tris/HCl (pH=8.0)-t és 50 mM Na-acetátot tartalmazó pufferben oldottuk fel. A minták RNS és fehérjetartalmát a *DNS tartalmú oldatok RNS és fehérjetartalmának eltávolítása* alcím alatt leírtak szerint távolítottuk el.

A tisztított plazmid emészthetőségét EcoRI-es emésztéssel vizsgáltuk, mennyiségét (plazmidtól függően 0.3-5 µg plazmid/ml baktériumtenyészet) az agaróz gél elektroforézis során kapott etídium-bromid (Sigma) festődés alapján becsültük.

DNS tartalmú oldatok RNS és fehérjetartalmának eltávolítása

A minták RNS tartalmát 1/200 térfogatú 10 mg/ml hőinaktivált T1 RN-áz (Sigma) hozzáadásával távolítottuk el. Az RN-áz harminc-hatvan perc alatt 37°C-on a minták RNS tartalmának >95 %-át teljesen megemésztette.

A plazmidpreparátum fehérjeszennyeződését fenolos (Tris-szel pufferelt fenol) extrakcióval távolítottuk el. Az egy térfogat fenollal végzett extrakciót addig ismételtük, ameddig a vizes és a fenolos fázis között fehérjecsapadékot észleltünk. A vizes fázis DNS-tartalmát két és fél térfogat tömény etanol és 1/10 térfogat 3 M Na-acetát puffer (pH=5.2) hozzáadásával csaptuk ki húsz percig -20°C-on. A centrifugálással ülepitett csapadékot 70 %-os etanollal mostuk, szárítottuk, majd 10-50 µl tridesztillált vízben vagy 10 mM Tris/HCl-ot (pH=8.0) és 2 mM EDTA-t tartalmazó pufferben oldottuk fel. A kicsapást ezután még egyszer megismételtük, hogy a minta fenoltartalma a későbbi kísérletekben ne okozzon zavarokat.

Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR-t a munkámban a CD43 citoplazmatikus szakaszának pHF1 plazmidról történő sokszorosítására használtam fel. A primerként alkalmazott oligonukleotidok a következők voltak:

5' CGGGGTACCAAGGAGGTCCCGCGGATGCGCCGGCGGCAGAAGCGG
 3' CGGGAATTCAAGCTTTTAAGGGGCAGCCCCGTC

Az 5' 45-mer primer tartalmazta a CD43cp 5' végét kódoló 18 nukleotidot (dőlt betűk) és egy Sac II-es restrikciós endonukleáz emésztési helyet (aláhúzott betűk). A 3' 33-mer primer tartalmazta a CD43cp 3' végét kódoló 18 nukleotidot (köztük a stop kodon) komplementerét (dőlt betűk) és az EcoRI hasítási helyet (aláhúzott betűk).

A PCR reakcióelegy 50 µl térfogatban az alábbi komponenseket tartalmazta: 20 pg pHF1 plazmid, 100-100 pmol 5' illetve 3' primer, 200-200 µM-t a négy dezoxiribonukleotidtrifoszfátból (Cetus dNTP mix), 2.5 U Taq polimerázt (Cetus), 3.5 mM MgCl₂-ot (Merck), 50 mM KCl-ot (Cetus), 10 mM Tris/HCl-ot (pH=8.8) (Cetus) és 0.1 % (w/v) BSA-t (Cetus). A PCR-t az alábbi programmal végeztük el:

1 x 94°C tíz perc,
30 x (94°C másfél perc, 55°C egy perc, 72°C egy perc)
1 x 72°C három perc

A PCR termékeket agaróz gél elektroforézissel vizsgáltuk.

DNS hasítás restrikciós endonukleázok segítségével

A DNS (plazmid, PCR termék) hely specifikus hasítására restrikciós endonukleázokat használtunk. A 0.1-5 µg DNS-t 0.2-10 U enzimmel hasítottuk egy-négy óráig 37°C-on a gyártók által javasolt körülmények között. A hasítás hatékonyságát agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük.

Munkámban az alábbi restrikciós endonukleázokat használtam (zárójelben az enzim forrása és az alkalmazott puffer):

ApaI (NEB, 0.5x univerzális puffer)
BamHI (Amersham, 1x univerzális puffer)
EcoRI (NEB, 1.5 x univerzális puffer)
PvuII (NEB, 3# optimális puffer)
SacII (NEB, 1# optimális puffer)

10 x univerzális puffer K-acetát 1M

Tris/acetát (pH=7.6) 250 mM
Mg-acetát 100 mM
 β -merkaptoetanol (Sigma) 5 mM
BSA (Amersham, DN-áz mentes) 100 μ g/ml

10 x 1# optimális puffer

Tris/HCl (pH=7.7) 250 mM
MgCl₂ 100 mM
Ditiotreitol (Sigma) 10 mM
BSA (Amersham, DN-áz mentes) 300 μ g/ml

10 x 3# optimális puffer

Tris/HCl (pH=7.7) 250 mM
MgCl₂ 100 mM
NaCl 500 mM
 β -merkaptoetanol (Sigma) 10 mM
BSA (Amersham, DN-áz mentes) 100 μ g/ml

Sokszor két restrikciós endonukleázzal kellett a DNS mintát emészteni. Amennyiben arra lehetőség volt, a gyártók javaslatai alapján olyan körülményeket kerestünk, amelyek mellett mindkét enzimreakció elfogadható mértékű volt. Amennyiben erre nem volt lehetőség, az első enzimmel történő emésztést követően a mintákat fenoloztuk, és az újra feloldott, már emésztett DNS-t a másik restrikciós enzimmel is hasítottuk.

A restrikciós endonukleázok aktivitását vagy a gyártó által javasolt körülmények között elvégzett hőinaktiválással (általában húsz perces 65°C-os inkubáció) vagy – amennyiben ilyen módszerrel az enzim aktivitása nem megszüntethető – az enzimek fenolos extrakciójával végeztük el.

Ligálás

Az aktív restrikciós endonukleázokat nem tartalmazó DNS darabok összekapcsolását T4 DNS ligázzal végeztük. Ehhez az összekapcsolni kívánt, megfelelő arányban összekevert DNS fragmenteket (0.1-3 μ g) 5-10 U T4 DNS ligáz (Sigma) és 1 mM Adenozin-trifoszfát (ATP) (Sigma) jelenlétében a gyártó által javasolt pufferben két óráig inkubáltuk 37°C-on.

Agaróz gél elektroforézis (Sharp és tsi. 1973)

A mintapufferben felvett, 200 bázispárnál hosszabb kettős szálú DNS darabok méret szerinti elválasztását az elválasztandó DNS fragment méretétől függően 0.6-2.0 % agarózt tartalmazó gélben 5 V/cm feszültség alkalmazása mellett elektroforézissal végeztük. Az elválasztott DNS darabokat az elektroforézis közben a DNS-hez kötődő etídium-bromid fluoreszcenciája alapján UV transzilluminátoron tettük láthatóvá. A géleket UVP géldokumentációs rendszer segítségével fényképeztük le.

Az egyes DNS darabok méretét különböző ismert méretű fragmenteket adó markerek (λ fág HindIII illetve HindIII+EcoRI emésztés, 100 bázispáros létra (Pharmacia)) segítségével határoztuk meg.

Gél:	analitikai tisztaságú agaróz (Sigma) 0.6-2.0 % (w/v) Etídium-bromid (Sigma) 10 μ g/ml TBE pufferben
TBE puffer:	Tris/borát 0.089 M Bórsav 0.089 M EDTA 0.002 M
6 x mintapuffer:	brómfenolkék (Merck) 0.25 % (w/v) xilén-cianol (Sigma) 0.25 % (w/v) glicerin 30 % (v/v)

Szekvenálás

A PCR termék bázissorrendjének meghatározását az MTA SZBK DNS szekvenáló szolgáltató egysége végezte a pBC-SK-CD43cp plazmidot templátként felhasználva. A biztosabb szekvencia-adatok érdekében a PCR terméket mindkét szálon megszekvenáltattuk a pBC-SK plazmidon elhelyezkedő szekvenciákhoz hibridizálódó T3 és T7 primerek segítségével.

Szekvencia analízis

A szekvencia analízist a GCG programcsomagban található algoritmusok segítségével végeztük.

4.4. Sejttenyésztési és sejtszeparálási módszerek

Sejttenyésztés

A különböző sejtvonalakat 100 NE/ml penicillinnel (Biogal), 100 µg/ml streptomocinnel (Egis) és 630 µg/ml glutaminnal (Sigma) kiegészített 5 % inaktivált fetális borjúsavót (FCS) tartalmazó RPMI tápoldatban tenyésztettük 37°C-on 5 % CO₂ jelenléte mellett.

1 l RPMI tápoldatra	RPMI por (Gibco) 10.4 g NaHCO ₃ 2 g pH-t 7.0-ra állítani cc.HCl-val
---------------------	--

Mononukleáris vérsejtek tisztítása perifériás vérből

Az egészséges véradóktól, illetve a sertésből és szarvasmarhából (Pick Rt., Szeged) származó vér alvadását heparinnal (0.05 mg/ml) akadályoztuk meg. A vért azonos térfogatú PBS-ben történő hígítás után óvatosan fél térfogat 75 %-os Ficoll - jodamid ($\rho=1.077$) oldatra rétegeztük, és húsz percig 250 g-n kilengőfejes rotorban centrifugáltuk szobahőmérsékleten. A két fázis határán összegyűlő perifériás vér mononukleáris sejtjeit (PBM) kétszer PBS-ben mostuk (Boyum 1968).

Tapasztalataink szerint az emberi PBM tisztításához használatos módszerrel a sertésből és a szarvasmarhából csak vörösvértestekkel és granulocitákkal közepesen szennyezett PBM szuszpenziót lehetett tisztítani. A két állatfaj PBM sejtjei könnyen összecsapódtak, amit részlegesen gátolni lehetett 0.05 mg/ml heparin és 10 % vérszérum hozzáadásával.

75 %-os Ficoll-jodamid oldat:	Ficoll-400 (Pharmacia)	9.56g
	Iodamide 380 (Bracco)	20 ml
	dH ₂ O	130 ml

Hemolízis

A sejtsuszpenziókat szennyező vörösvértesteket hemolízissel távolítottuk el. Nagy mértékű vörösvértest szennyezéskor, illetve teljes fehérvérsejt-preparátum készítésekor a sejteket desztillált vízben szuszpendáltuk fel, majd az izotóniás viszonyokat tíz másodperc múlva azonos térfogatú kétszeres töménységű PBS-sel állítottuk vissza.

Ezt követően, illetve kis mértékű vörösvértest szennyeződéskor az előzőnél kíméletesebb Guy-féle hemolízist alkalmaztuk. Ennek során a sejteket Guy hemolizáló oldatban (7 egység dH₂O, 2 egység Guy A, 0.5 egység Guy B, 0.5 egység Guy C) felfuszpendáltuk, majd ebben az enyhén hipotóniás pufferben centrifugálással összegyűjtöttük. A centrifugálást követően az izotóniás körülményeket visszaállítottuk.

Guy A: 1000 ml-re dH ₂ O-zel	NH ₄ Cl	35 g
	KCl	1.85 g
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	1.5 g
	KH ₂ PO ₄	0.12 g
	D-glükóz	5 g
	Fenol-vörös	0.05 g
Zselatin (Sigma)	25 g	
Guy B: 1000 ml-re dH ₂ O-zel	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	4.2 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1.4 g
	CaCl ₂	3.4 g
Guy C: 1000 ml-re dH ₂ O-zel	NaHCO ₃	22.5 g

A sejt szám és a sejtek életképességének megállapítása

A sejteket Bürker-kamra segítségével számoltuk meg. Amikor ezzel párhuzamosan az élő sejtek arányára is kíváncsiak voltunk, a sejteket tízszeresére hígítottuk 0.2 % (w/v) Tripán-kéket tartalmazó fiziológiás sóoldatban. Ilyenkor az élő sejtek arányát a Tripán-kéket kizáró sejtek és az összes sejt aránya adta. Általában a kísérletekhez felhasznált mintákban az élő sejtek aránya meghaladta a 95 %-ot.

4.5. Fehérje-biokémiai módszerek

A proteolitikus folyamatok gátlása

A fehérjék proteolitikus bomlását a hőmérséklet alacsonyan tartásával (a kísérleteket jégen végeztük) és proteázgátlókkal csökkentettük valamennyi fehérjéssel végzett kísérletben. Az alkalmazott proteázgátlókat a feltüntetett koncentrációkban általában koktélokban alkalmaztuk:

- aprotinin (Sigma) - szerin-proteázgátló - 10-30 µg/ml
- EGTA (Sigma) vagy EDTA - metallo-proteázgátló - 2-10 mM
- jodoacetamid (Sigma) cisztein-proteázgátló - 1-5 mM
- leupeptin (Sigma) - szerin-proteázgátló - 10-30 µg/ml
- para-nitrofenil-p'-guanidino-benzoát (Sigma) szerin-proteázgátló - 25 µM
- fenil-metil-szulfonil-fluorid (Sigma) - szerin-proteázgátló - 1 mM

Lizátum készítése bakteriális sejtekből

A mintákat kisebb mennyiségű sejt esetén kétszer tíz másodperces szonikálással, nagyobb mennyiségű sejt esetén French press segítségével tártuk fel proteázgátló koktélt tartalmazó PBS-ben. A sejtörmeléket tizenöt perces centrifugálással (2500 g, kilengőfejes rotor) üleptettük. A lizátumot felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A túltermelt GST illetve GST tartalmú fúziós fehérjék tisztítása

A GST-t (Glutathion-S-transzferáz), illetve a GST-fúziós fehérjét túltermelő baktérium lizátumát vattán és szűrőpapíron előtisztítottuk, hogy az oszlopokat eltömő durva szennyeződések káros hatásait kiküszöböljük. A lizátumot ezután először BSA-Sepharose 4B oszlopon engedték át, hogy a gyöngyökhöz és a fehérjékhez aspecifikusan tapadó bakteriális fehérjéket eltávolítsuk, majd a mintát Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia) oszlopon affinitás-tisztítottuk. A mátrixhoz kötött glutathion a lizátumból a GST-t és a GST-fúziós fehérjéket szelektíven megkötötte. Az oszlopról nagy térfogatú PBS-sel mostuk le a glutathionhoz nem kötődő fehérjéket.

Ha a teljes fúziós fehérjét akartuk izolálni a glutathion kötött fehérjéket tartalmazó gyöngyöket kétszer húsz percig oszloptérfogatú 10 mM glutathiont (Sigma), 0.1 % (v/v) TritonX 100-at és 50 mM Tris/HCl (pH=8.0)-ot tartalmazó elúciós pufferes közegben kevertettük szobahőmérsékleten. Megfigyeléseink szerint a glutathionos affinitás-elúció a GST és a GST-fúziós fehérjék csak mintegy felét távolította el az oszlopról. Amikor ennél jobb nyeredékre volt szükségünk és a fehérje konformációjának esetleges megváltozása nem befolyásolta alapvetően a kísérlet kimenetelét, pH elúciót alkalmaztunk. Az oszlopról a fehérjét kétszer egy percig oszloptérfogatú 0.1 M glicin /HCl (pH=2.7) pufferral eluáltuk. Az eluátum savas pH-ját 1/10 térfogatú 1 M Tris/HCl (pH=9.0) oldattal semlegesítettük.

Amennyiben csak a fúziós tagot akartuk tisztítani, az oszlophoz oszlop térfogatú PBS-ben oldott 20 U/ml specifikus aktivitású thrombint (Pharmacia) adtunk. Tizenhat órás szobahőmérsékletű emésztés hatására a fúziós fehérje gyakorlatilag teljes mértékben az oszlophoz továbbra is kötött GST-re és a felülúszóban található fúziós tagra különült.

Abban az esetben, ha nagy tisztaságú preparátumra volt szükségünk, a fúziós tagot tartalmazó fehérjeoldatot – amely sok kis proteolitikus bomlásból származó

peptidet is tartalmazott – a gyártó utasításai szerint duzzasztott és megöntött Sephadex G-25 Medium (Pharmacia) gélszűrő oszlopon tisztítottuk tovább.

A Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia) oszlopot ugyancsak nagy térfogatú 0.1 M glicin/HCl (pH=2.7) pufferrel regeneráltuk, és 0.1% NaN₃-ot tartalmazó PBS-ben tároltuk. Bár az összes fehérjét ezzel a módszerrel sem sikerült a mátrixról eluálni, az oszlop többször felhasználható volt.

Az egyes tisztítási lépéseket és az oszlop regenerálását mennyiségileg a frakciók OD₂₈₀-ának mérésével, minőségileg a frakciók SDS PAGE-sel történő elemzésével ellenőriztük.

A túltermelt GST-fúziós fehérjék elemzése tömegspektrometriával

A tömegspektrometriai méréshez a fehérjeoldatot sómentesíteni kellett. A sótartalom csökkentése könnyen a fehérje kicsapódásához vezethet, több oldat kipróbálása után végül is az 5 %-os ecetsav vált be sómentes oldószerként. Tapasztalataink szerint az általunk tisztított fehérje sótartalma még két napos dialízissel sem volt olyan mértékben lecsökkenthető, hogy az a tömegspektrometriai mérést lehetővé tegye. Ezért a fehérjeoldatot az *A túltermelt GST illetve GST tartalmú fúziós fehérjék tisztítása* alcím alatt részletezett módon gélszűrővel sótlanitottuk.

Az 5 %-os ecetsavban oldott fehérje molekulaszúlyát a SZOTE Orvosi Vegytani Intézetében electrospray ionforrással felszerelt Finnigan TSQ 7000 quadrupol tömegspektrométerben határoztuk meg.

Lizátum készítés állati eredetű sejtekből

A sejteket 1-5 x 10⁷ sejt/ml koncentrációban lízis pufferben szuszpendáltuk, majd tíz-húsz perces inkubációval feltártuk. A sejtmagokat tíz percig üleptítettük 13000 g-n történő centrifugálással. A lizátumokat -80 °C-on tároltuk felhasználásig.

Lízis puffer:	Triton-X 100 (Sigma) 1 % (v/v) vagy Nonidet-P 40 (Sigma) 1 % (v/v) Tris/HCl (pH=7.4) 10-50 mM NaCl 150 mM MgCl ₂ 0.5-2 mM proteázgátló koktél
---------------	---

Membránpreparátum készítése

A sejteket $1-5 \times 10^7$ sejt/ml koncentrációban tíz-húsz percig 10 mM Tris/HCl (pH=7.4)-ot, 0.5 mM $MgCl_2$ -ot és proteázgátló koktélt tartalmazó hipotóniás duzzasztó pufferben duzzasztottuk, majd a sejteket Dounce-homogenizátorban tártuk fel. A feltárás mikroszkópos ellenőrzése után a homogenizátumot izotóniássá tettük megfelelő mennyiségű 150 mM NaCl oldat hozzáadásával. A durva sejtörmeléket húsz perces centrifugálással (500 g, kilengőfejes rotor) távolítottuk el. A felülúszóhoz EDTA-t adtunk 5 mM végkoncentrációban. A felülúszóból a membránfrakciót egy órás ultracentrifugálással (30.000 g, kilengőfejes rotor) ülepítettük. A membrán-frakciókat $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk felhasználásig.

SDS poliakrilamid gél elektroforézis (SDS PAGE)

Fehérjeelegyek minőségi vizsgálatára és a fehérjék látszólagos molekulásúlyának meghatározására poliakrilamid gél elektroforézist alkalmaztunk (Laemmli 1970). Az esetek többségében 5 %-os gyűjtő gélt és az elválasztandó fehérjék molekulásúlyától függően 5-15 %-os futtató gélt használtunk. Ritkán alkalmaztunk gradiens géleket, amikor a gradienst 5 %-os és 15 %-os futtató géloldatból gradiens keverővel állítottuk elő (Matsudaira és Burgess 1978).

Gyűjtő gél: Akrilamid (Serva) 3-5 % (w/v)
 N,N-metilén-bisakrilamid (Serva) 0.8/30*(3-5) % (w/v)
 Tris/HCl (pH=6.8) 125 mM
 SDS 0.1 % (w/v)
 N,N,N,N,-tetrametil-etiléndiamin (Merck) 0.0007 % (v/v)
 Ammónium-peroxid-diszulfát 0.00035 % (w/v)

Futtató gél: Akrilamid (Serva) 5-15 % (w/v)
 N,N-metilén-bisakrilamid (Serva) 0.8/30*(5-15) % (w/v)
 Tris/HCl (pH=8.8) 375 mM
 SDS 0.1 % (w/v)
 N,N,N,N,-tetrametil-etiléndiamin (Merck) 0.0007 % (v/v)
 Ammónium-peroxid-diszulfát 0.00035 % (w/v)

Futtató puffer: glicin 192 mM
 Tris 25 mM
 SDS 0.1 % (w/v)

A mintákat (tisztított fehérje, lizátumok, immunprecipitátumok, membránpreparátumok) az elektroforézis előtt SDS tartalmú redukáló mintapufferben öt percig forraltuk, hogy a fehérjék harmadlagos szerkezetét megbontsuk. A fehérjéket 5-10 V/cm feszültség mellett választottuk el. Az egyes fehérjéknek megfelelő molekulásúlyokat standardok (Sigma) segítségével határoztuk meg.

Redukáló mintapuffer: Tris/HCl (pH=6.8) 125 mM
 SDS 0.2 % (w/v)
 glicerin 5 % (v/v)
 β -merkaptoetanol (Sigma) 1 % (v/v)
 néhány kristály brómfenolkék (Merck)

A gélek fehérjetartalmát vagy membránra transzferáltuk vagy megfestettük. Leggyakrabban a Coomassie Brilliant Blue R-250-re alapuló festési módszert használtuk. A géleket húsz percig festettük 0.1 % (w/v) Coomassie BB R-250-et, 10 % (v/v) ecetsavat és 40 % (v/v) metanolt tartalmazó festőoldatban, majd kettő-tizenhat óráig tartó 10 % (v/v)-os ecetsavoldatban történő rázatással távolítottuk el a gélből a nem fehérjéhez kötődő festéket. Amennyiben érzékenyebb módszerre volt szükségünk, a gél Imidazol-SDS-Cink reverz festési módszerrel felülfestettük (Fernandez-Patron és tsi. 1995). A Coomassie BB R-250 festett géleket kétszer desztillált vízzel öblítettük. A géleket tizenöt percig 0.2 M imidazolt és 0.1 % (w/v) SDS-t tartalmazó oldatban rázattuk, majd tizenöt-hatvan másodpercre áthelyeztük 0.2 M cink-szulfát oldatba. A reakció során a gél fehérjét nem tartalmazó részén fehér csapadék képződött, ami lehetővé tette a kis mennyiségben jelen lévő fehérjék láthatóvá tételét. A reakciót desztillált vízzel állítottuk le.

A fehérjék transzferálása poliakrilamid gélből membránra

A gél 30 percig rázattuk a transzferálásra használt pufferben, majd elektroforetikus úton a transzferálás előtt a gyártó utasításai szerint nedvesített nitrocellulóz (Schleicher and Schuell) vagy polivinilidén-difluorid (Millipore) membránra transzferáltuk. A transzferálást négy-tizenhat óráig 100-200 mA áramerősség mellett hagyományos módszerrel (transzfer puffer 192 mM glicin és 25 mM Tris) vagy (kis molekulásúlyú fehérjék vizsgálata esetén) húsz-harminc percig 200-800 mA áramerősség mellett félszáraz blot készülékben végeztük (transzfer puffer 39

mM glicin és 48 mM Tris). A transzferálás hatékonyságát a gélben visszamaradt fehérjék Coomassie BB festésével ellenőriztük.

Peptidszintézis

A munkámban felhasznált CD43(352-372) peptid szintézisét az Orvosi Vegytani Intézetben végezték el a ^tBoc módszer alapján (Merrifield, 1963). A szintézis után a peptideket 10 % (v/v)-os ecetsavban vették fel, és a kívánt peptidet szemipreparatív reverz fázisú magas nyomású folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) C-18 oszlopon tisztították, 0-48 %-os acetonitril lineáris gradienst használva. A megfelelő frakciókat összegyűjtötték és liofilizálták. A szintetizálni kívánt termék szerkezetét tömegspektrometriával és aminosav összetétel elemzésével igazolták, tisztaságát (>97 %) pedig HPLC-vel állapították meg.

Peptidek konjugálása hordozóhoz

Az immunizálásra használt CD43(352-372)-BSA konjugátumot a SZOTE Orvosi Vegytani Intézetében készítették úgy, hogy a PBS-ben 1:10 moláris arányban oldott peptidet és a hordozó fehérjét aminocsoportjaikon keresztül glutárdialdehiddel keresztkötötték.

Affinitásmátrixok előállítása

Az affinitáskromatográfias oszlopokat a szabad aminocsoport tartalmú peptidek vagy fehérjék CNBr aktivált Sepharose 4B (Pharmacia) gyöngyökhöz történő kötésével a gyártó javaslatai szerint készítettük. Az 1 g CNBr aktivált gyöngyöt tizenöt percig 10 ml 1 mM HCl-ban duzzasztottuk, majd 200 ml 1 mM HCl-dal és 5 ml 0.5 M NaCl-ot tartalmazó 0.1 M NaHCO₃ (pH=8.3) pufferrel mostuk szinterüvegszűrőn. Ezután 1 g gyöngyökhöz 0.5 M NaCl-ot tartalmazó 0.1 M NaHCO₃ (pH=8.3) pufferben feloldott vagy ezen pufferrel szemben éjszakán át dializált 2-10 mg aktív aminocsoportot tartalmazó peptidet vagy fehérjét adtunk, és a mintákat két órán át szobahőmérsékleten kevertettük. A gyöngyökön esetlegesen megmaradó aktív csoportokat 0.2 M glicinnel közömbösítettük. Az affinitás-mátrixhoz nem kovalensen kötődő fehérjéket vagy peptideket négyszeres, 30-30 ml 0.5 M NaCl-ot tartalmazó 0.1 M NaHCO₃ (pH=8.3) pufferrel, illetve 0.5 M NaCl-ot tartalmazó 0.1 M Na-acetát (pH=4.0) pufferrel történő

mosással távolítottuk el. A gyöngyöket ezután oszlopba töltöttük és 0.1 % (w/v) NaN_3 tartalmú PBS-ben tároltuk.

A fehérjék kapcsolását az OD_{280} , a peptidek kapcsolását pedig az OD_{236} követésével kísértük nyomon. A gyöngyökhöz ténylegesen kapcsolódó molekulák mennyiségét – ezáltal a kapcsolat hatékonyságát – a gyöngyökhöz kapcsolat előtt adott összes és a kapcsolást követően a gyöngyökhöz nem kapcsolódó molekulák mennyiségének különbsége adta. Amikor fehérjeelegyet kapcsoltunk Sepharose 4B gyöngyökhöz (például bakteriális lizátumot), a teljes és a nem kapcsolódó fehérje frakció fehérjetartalmát SDS PAGE-vel elemeztük, hogy a kötődés szelektív jellegét figyelemmel kísérjük.

4.6. Immunkémiai módszerek

Indirekt ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

A 100-100 μl kötő pufferben feloldott 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú fehérjét (pl. az immunizálásra felhasznált antigént, haptént vagy antigén tartalmú fehérjeelegyet) három órán át 37°C -on vagy tizenkét-tizenhat órán át 4°C -on kötöttük a hajlékony ELISA lemez (Falcon) mintahelyeinek falához. Rövid desztillált vizes öblítés után a mintahelyeket 200 μl 0.5 % (w/v) BSA-t (vagy zselatint) és 0.1 % (v/v) Tween 20-at (Sigma) tartalmazó PBS-sel telítettük egy óráig 37°C -on. Ezt követően 100 μl térfogatban a mintahelyekbe pipettáztuk a tesztelendő ellenanyagot különböző (általában harmadoló vagy tizedelő) hígításokban és egy óra hosszat inkubáltuk 37°C -on. A lemezt háromszor mostuk 0.1 % (v/v) Tween 20-at tartalmazó PBS-sel, hogy az antigént nem kötő immunglobulinokat eltávolítsuk, majd a mintánkhoz 100-100 μl ötszázszoros hígítású tormaperoxidázzal konjugált ProteinA-t (Sigma) adtunk. Hatvan perces 37°C -os inkubáció után a főlöslegben lévő ProteinA-tormaperoxidáz konjugátumot háromszoros 0.1 % (v/v) Tween 20-at tartalmazó PBS-es mosással távolítottuk el. A mintákhoz 200 μl OPD szubsztrátoldatot adtunk, majd a megfelelő színintenzitás elérése után (általában öt-tíz perc múlva) a reakciót 50 μl 2 M H_2SO_4 -val leállítottuk. Az egyes mintákban a képződött színes termék mennyiségét 492 nm-es hullámhosszon ELISA reader (Titertek) készülék segítségével határoztuk meg.

Kötő puffer (coating buffer): Na_2CO_3 15 mM
 NaHCO_3 35 mM
pH = 9.6-ra NaHCO_3 kristályokkal

OPD szubsztrátpuffer: citromsav 5.6 mg/ml
 Na_2HPO_4 11.2 mg/ml
Orto-fenileén-diamin 330 $\mu\text{g/ml}$
(30%-os) H_2O_2 0.2 $\mu\text{l/ml}$

Immunprecipitáció

Az immunprecipitációt mintánként 10 μl ProteinA-Sepharose CL4B (Pharmacia) gyöngyökkel végeztük. Az ellenanyagokat 500-1000 μl PBS-ben hígítva egy óráig hagytuk a gyöngyökhöz kötődni 4°C-on kevertetés mellett, majd a nem kötődő immunglobulint háromszor 1 ml PBS-sel mosva távolítottuk el. A nyúl immunglobulinokból mintánként 5-10 μg -ot használtunk fel. Amíg a ProteinA valamennyi nyúl immunglobulin alosztályt köti, addig az egér ellenanyagoknak (mEa-ok) csak néhány izotípusát. Ezért amennyiben mEa-kal immunprecipitáltunk, a gyöngyökhöz először 2-5 μg nyúlban termelt affinitás-tisztított anti-egér-immunglobulint (DAKO) adtunk, majd a mosások után a gyöngyökhöz kötődő ellenanyagokhoz kapcsoltuk az 5-10 μg mennyiségű mEa-ot.

A felszínükön kötött immunglobulinokat tartalmazó gyöngyökhöz kétszeri lízis pufferrel történő mosást követően hozzáadtuk a megfelelő lizátumo(ka)t. Hatvanhárom perces kevertetés után az ellenanyaghoz nem kötődő fehérjéket háromszoros lízis pufferben történő mosással távolítottuk el.

A fehérjék kimutatása Western blot (immunoblot) segítségével

Amennyiben nem előre festett fehérje-markereket használtunk, a membránokról a markereket tartalmazó levágott részt egy percre festettük 0.1 % (w/v) Coomassie BB R-250-et, 10 % (v/v) ecetsavat és 40 % (v/v) metanolt tartalmazó festőoldatban, majd a nem fehérjéhez kötődő festéket öt-tíz percre 50 % (v/v)-os metanollal távolítottuk el. A membrán Western blottolásra felhasználni kívánt részét ezután telítettük 3-5 % (w/v) sovány tejport és 0.1 % (v/v) Tween 20-at (Sigma) tartalmazó TBS-ben tizenkét-tizenhat órán keresztül 4°C-on vagy hatvan percen keresztül szobahőmérsékleten, majd egy-három óráig rázattuk az első ellenanyagot tartalmazó telítéshez használt pufferben. Ezután ötször három percre 0.1 % (w/v) Tween 20-at (Sigma) tartalmazó TBS-sel

távolítottuk el az antigénhez nem kötődő ellenanyagokat. A membránt ezután a tormaperoxidáz konjugátumot tartalmazó telítő pufferben hatvan percig rázattuk. Attól függően, hogy az első ellenanyag mEa vagy nyúlserum volt-e, affinitás-tisztított nyúlban termelt anti-egér-immunglobulin-tormaperoxidáz konjugátumot (DAKO) vagy ProteinA-tormaperoxidáz konjugátumot (Sigma) használtunk. Biotinilált első ellenanyagok esetében a használt konjugátum a Streptavidin-tormaperoxidáz (DAKO) volt. Az előzőekben leírt módon történt mosások után a membránt TBS-ben öblítettük.

Az alkalmazott első ellenanyagok és a tormaperoxidáz konjugátumok koncentrációit az előkísérletek, a gyártók utasításai és az alkalmazott vizualizálási módszer ismeretében határoztuk meg.

Az immunjelöléseket előhívhattuk a gyártó által javasolt módon lumineszcens tormaperoxidáz szubsztráttal (Enhanced Chemiluminescence Reagent Kit, Amersham), amikor az enzimreakció eredményeképpen létrejövő fényt röntgenfilm (Dupont Cronex 4) segítségével mutattuk ki, vagy különböző kromogén szubsztrátokkal – amelyek közül mi leggyakrabban a diamino-benzidint használtunk – amikor oldhatatlan színes csapadék jelezte a pozitív reakciót.

Diamino-benzidin kromogén: diamino-benzidin (Sigma) 1 mg/ml
NiCl₂ x 6 H₂O 0.5 mg/ml
(30 %-os) H₂O₂ 0.5 µl/ml
TBS-ben

4.7. Immuncitokémiai módszerek

Indirekt immunfluoreszcencia

A kísérleteket 96 mintahelyet tartalmazó gömbölyű fenekű mikrotiter lemezekben (Greiner) végeztük mintánként 1-5 x 10⁵ sejtet felhasználva.

Ha intracelluláris antigéneket vizsgáltunk, a sejteket 25-50 µg/ml vízdékony digitoninnal (Sigma) permeabilizáltuk tíz percig jégen 2 mM EGTA-t, 2 mM MgCl₂-ot és 1 % (w/v) BSA-t tartalmazó PBS-ben. (A vízdékony digitoninfrakció előállítását lásd Oettgen és tsi. 1986.) A megfelelő fokú permeabilizálást a Tripán-kék kizárás megszűnése jelezte. A további lépések előtt a sejteket kétszer mostuk 1 % (w/v) BSA-t tartalmazó PBS-ben.

Az 1 % (w/v) BSA-t tartalmazó PBS-ben vagy 5 % (v/v) FCS-t tartalmazó RPMI-ben feloldott első ellenanyagot negyvenöt-hatvan percig hagytuk az antigénhez kötődni. A sejteken esetlegesen meglévő Fc-receptorokat normál szérummal blokkoltuk, lehetőség szerint annak a fajnak a szérumát felhasználva, amelyből a sejt származott. A humán PBM sejtek a nyúl ellenanyagokat olyan erősen kötötték, hogy a normál humán szérum a nyúl-ellenanyagok sejt felszíni kötődését nem gátolta megfelelő mértékben. Az első ellenanyagot ilyenkor biotiniláltuk és a biotinilált nyúl-immunglobulinok aspecifikus helyre történő kötődését normál nyúlszérummal gátoltuk. Amennyiben permeabilizált sejtek antigénjeit vizsgáltuk biotinilált ellenanyagok segítségével, az intracelluláris biotin kötő helyeket 10 µg/ml koncentrációjú d-biotinnal (Sigma) telítettük. A sejteket az első ellenanyaggal történő inkubálás után háromszor mostuk 1 % (w/v) BSA-t tartalmazó PBS-ben vagy 5 % FCS-t tartalmazó RPMI-ben, hogy a nem kötődött ellenanyagot eltávolítsuk. A megfelelő hígítású fluoreszcens vegyülettel konjugált reagenst harminc percig hagytuk az első ellenanyaghoz kötődni. A fluorokróm leggyakrabban FITC (fluoreszcein- izotiocianát), ritkábban – elsősorban kettős festéseknél – PE (fikoeritrin) volt. A fluoreszcens vegyülettel konjugált reagens lehetett affinitás-tisztított nyúlból származó anti-egér- (FITC és PE konjugátum, Sigma) vagy kecskéből származó anti-nyúl- immunglobulin (FITC konjugátum, Sigma), attól függően, hogy az első ellenanyag mEa vagy affinitás-tisztított nyúlszérum volt-e, illetve streptavidin (FITC konjugátum, DAKO, PE konjugátum Calbiochem) ha az első ellenanyag biotinilált preparátum volt. Az első ellenanyaghoz nem kötődő fluoreszcens vegyületekkel konjugált reagenseket háromszori 1 % (w/v) BSA-t tartalmazó PBS-ben vagy 5 % (v/v) FCS-t tartalmazó RPMI-ben történő mosással távolítottuk el, majd a sejteket még egyszer megmostuk PBS-ben. Áramlási citometriás kiértékelésnél gyakran az utolsó lépésnél a sejteket 1-10 µg/ml PI-t (propídium-jodid) (Sigma) tartalmazó PBS-ben vettük fel. Amennyiben a kiértékelést nem tudtuk rögtön elvégezni, a sejteket 0.2 % (w/v) formaldehidet tartalmazó PBS-ben rögzítettük.

Sejten belüli és sejt felszíni antigének egyidejű kimutatásánál először a sejt felszíni komponenst a megfelelő ellenanyaggal és fluorokróm konjugátummal megjelöltük, majd a sejteket permeabilizáltuk. Megfigyeléseink szerint a permeabilizálás folyamata nem befolyásolja károsan a sejt felszíni antigének jelölését. A permeabilizálás

után egy, a sejtfelszíni antigén megjelölésével nem interferáló módszerrel megjelöltük az intracelluláris antigéneket is.

A jelöléshez használatos egyes komponenseket 1 % (w/v) BSA-t tartalmazó PBS-ben vagy 5 % (v/v) FCS-t tartalmazó RPMI-ben hígítottuk a gyártó javaslatai, valamint az általunk végzett előkísérletek eredményei alapján. Általában az alkalmazott reagens koncentrációk 1 és 10 µg/ml közé estek. Az egyes lépéseket jégen végeztük, hogy a sejtmembrán fluiditását csökkentsük, ezáltal az antigének nem kívánt eloszlásváltozásait (foltok és sapkák képződése) elkerüljük. A kísérletekben negatív kontrollként médiumot (első ellenanyag elhagyása) és a célsejttel nem reagáló aspecifikus első ellenanyagot (mEa-ok esetén izotípus egyeztetés) alkalmaztunk. Amikor arra lehetőség volt, a sejteket biztosan felismerő ellenanyagot is használtunk pozitív kontrollként.

Az igen-nem típusú kiértékelést Zeiss-Jena Jenalumar SH250 fluoreszcens mikroszkóppal végeztük. Amikor mennyiségi jellemzőkre is szükségünk volt, áramlási citometriás módszert alkalmaztunk (Becton-Dickinson FACSstar +). A mérési eredményeket a Becton-Dickinson CellQuest szoftverével analizáltuk. Az élő sejteket a fényszórási (FSC (Forward scatter) és SSC (Side Scatter)) tulajdonságaik és a PI kizárás alapján kapztuk. A permeabilizált sejteket az esetlegesen nem permeabilizálódott sejtektől a fényszórási tulajdonságaik és PI festődésük alapján választottuk el, a permeabilizálás során ugyanis a sejtek FSC értéke csökken, SSC értéke pedig általában nő, és a permeábilis sejtek a PI-t sem képesek kizárni. A permeabilizálás előtt már halott, tehát már akkor permeábilis sejteket a megfelelő mennyiségű PI festődés alapján kapztuk ki. Az élő és osztódó sejtek DNS-tartalma (PI festődése) ugyanis jellegzetes kettős csúcsú hisztogrammot mutat, míg a permeabilizáláskor már halott sejtekben a DNS mennyisége ennél jóval kevesebb.

4.8. Hisztológiai és immunhisztokémiai módszerek

Tárgylemezek előkezelése

Ha nem állt rendelkezésünkre gyárilag előtisztított tárgylemez, a zsírtalanítást mosogatószeres mosást követő desztillált vizes öblítésekkel végeztük. A felhasználás előtt az esetleges szennyeződéseket acetonnal távolítottuk el.

A metszetek leázásának kiküszöbölésére a tárgylemezek acetonos öblítése után a tárgylemezeket két percig 2 % (v/v) 3-aminopropil-trietoxiszilánt (Sigma) tartalmazó acetomba helyeztük, majd öt percig desztillált vízzel öblítettük. A felhasználás előtt a lemezeket egy napig szárítottuk 56°C-on.

Fagyasztott metszetek készítése

A frissen boncolt szerveket megfelelő méretűre vágtuk, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és a metszésig -80°C-on tároltuk a kiszáradást megelőzendő parafilmbe csomagolva. A metszés előtt a fagyott szervet szintetikus beágyazó szerbe (Tissue Tek)-be ágyaztuk, majd kriosztáton 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket 3-aminopropil-trietoxiszilánnal előkezelt tárgylemezekre vittünk fel. A metszeteket szárítás után tíz percig acetonban rögzítettük, majd egy napos szárítás után a felhasználásig -80°C-on tároltuk. A felhasználás előtt a metszeteket PBS-ben húsz percig rehidratáltuk. Egyéb előkezelést az immunhisztokémiai festés előtt ezek a metszetek nem igényeltek.

Neutrális pufferelt formalinnal (NPF) rögzített paraffinba ágyazott metszetek készítése

A megfelelő méretűre vágott szerveket egy-két napig neutrális pufferelt formalinban (4 % formaldehid PBS-ben) rögzítettük, majd rutin beágyazási folyamat során paraffinba ágyaztuk (SZOTE Patológiai Intézet). A paraffinos blokkokból 2-3 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket 3-aminopropil-trietoxiszilánnal előkezelt tárgylemezekre vittünk fel és egy napig 56°C-on szárítottuk. A metszeteket ezt követően felhasználásig szobahőmérsékleten tároltuk.

Az immunhisztokémiai festés előtt a NPF-ban rögzített paraffinba ágyazott metszeteket négyszer öt percig xilolban deparaffináltuk, majd négyszer egy percig híguló etanolsorban (96 % (v/v), 90 % (v/v), 80 % (v/v) és 70 % (v/v)) rehidratáltuk. A metszeteket ezután öt percig metanolba, majd harminc percig 0.5 % (v/v) H₂O₂-ot

tartalmazó metanolba merítettük, hogy a szövetek endogén peroxidáz aktivitását csökkentjük. A metszeteket ezután csapvízben többször megmostuk, majd öt percig az epitóp visszanyerési módszerhez alkalmazott pufferben állni hagytuk.

Epitóp visszanyerési módszerek

Az immunhisztokémiai jelöléseknél számos ellenanyag esetében epitóp visszanyerési módszerek alkalmazására nem volt szükség. A legtöbb ellenanyag esetében azonban vagy proteolitikus emésztést vagy renaturációt kellett alkalmaznunk. Ritkán a két módszert együtt alkalmazva kaptunk optimális reakciót.

A proteolitikus emésztést pronáz enzimmel (Calbiochem) végeztük. A kezelés időtartamát és az enzim koncentrációját általában előkísérletek során optimalizáltuk. A rutin munkában azonban a PBS-ben vagy TBS-ben oldott 0.1 % (w/v) pronázzal történő három perces szobahőmérsékletű emésztés a legtöbb esetben kielégítő eredményt adott. A pronáz enzim proteolitikus aktivitása 2 % (w/v) glicint tartalmazó PBS-sel gátolható, ezt a lépést azonban a rutin munkában általában elhagytuk.

A renaturációs módszerek közül a nedves hővel történő epitóp visszanyerést alkalmaztuk. A metszeteket 0.1 M citrát pufferbe (pH=6.0) helyeztük és mikrohullámú sütőben forrásba hoztuk, majd háromszor öt percig forrásban tartottuk. Az esetlegesen elpárolgó puffert a metszetek kiszáradását megakadályozandó pótoltuk. A kezelés után a metszeteket a pufferben hagytuk szobahőmérsékletre hűlni.

Immunhisztokémiai jelölés

A megfelelően előkészített metszetek fehérjekötő helyeit 2 % (w/v) BSA-t tartalmazó PBS-ben telítettük harminc-hatvan percig. A fagyasztott technikák esetében az Fc-receptorok immunglobulin-kötő helyeit normál szérummal telítettük. A normál kecske- vagy nyúlserumot lehetőség szerint kiegészítettük annak a fajnak a normál szérumával, amelyből a metszet származott. Az archivált módszereknél a NPF-nal történő rögzítés során az Fc-receptorok irreverzibilisen denaturálódnak, így azok esetében a normál szérumok használatát legtöbbször elhagytuk.

A metszetek immunhisztokémiai festésére leggyakrabban a három lépcsős, avidin-biotin erősítő rendszeren alapuló indirekt immunperoxidáz módszert alkalmaztunk. Az első ellenanyagot (mEa vagy antiszérum) fagyasztott technikák

esetén harminc-hatvan percig, archivált módszereknél éjszakán át hagytuk az antigénhez kötődni, amit háromszor három-öt perces mosás követett PBS-ben. Az affinitás-tisztított biotinilált ellenanyag-preparátumot, az első ellenanyag fajtájától függően nyúlban termelt anti-egér- vagy kecskében termelt anti-nyúl-immunglobulint (vagy ezek Fab₂ fragmentjét) (DAKO) fagyasztott metszetek esetében húsz-harminc percig, archivált metszetek esetében negyvenöt-hatvan percig hagytuk az első ellenanyaghoz kötődni. Az előzőekhez hasonló mosások után a Sterptavidin- (vagy Extravidin-) tormaperoxidáz konjugátumot (DAKO ill. Sigma) fagyasztott metszetek esetében húsz-harminc percig, archivált metszetek esetében negyvenöt-hatvan percig hagytuk a biotinilált kapcsoló ellenanyaghoz kötődni. A nem kötődő tormaperoxidáz konjugátumot háromszor három-öt percig tartó mosással távolítottuk el.

Egy esetben tormaperoxidázzal közvetlenül konjugált ellenanyagot is alkalmaztunk. Erre akkor került sor, amikor egy nyúlban előállított ellenanyaggal kívántunk nyútból származó metszeteket vizsgálni. Az indirekt megközelítés ebben az esetben nem volt lehetséges, mert a második anti-nyúl-immunglobulin a szöveteket átítató szérum ellenanyagait felismerve erős háttérrel okozott volna. A direkt konjugátumot az indirekt módszernél leírt, első ellenanyagnál alkalmazott körülmények között hagytuk az antigénhez kötődni, majd a nem kötődő konjugátumokat háromszor három-öt percig tartó mosással távolítottuk el.

Az immunhisztokémiai lépéseket – a metszetek kiszáradását megelőzendő – nedves kamrában végeztük. Az egyes komponenseket 2 % BSA-t tartalmazó PBS-ben hígítottuk a gyártó javaslatai, illetve az általunk végzett előkísérletek eredményei alapján. Általában az alkalmazott reagens koncentrációk 1 és 10 µg/ml közé estek. A kísérletekben negatív kontrollként médiumkontrollt (első ellenanyag elhagyása) és a szövettel nem reagáló aspecifikus első ellenanyagot (mEa-ok esetén izotípus egyeztetés) alkalmaztunk. Amikor arra lehetőség volt, pozitív kontrollként használtunk a szövetekkel biztosan reagáló ellenanyagot is.

A metszeteket öt percig inkubáltuk 0.2 M Na-acetát pufferben (pH=4.6), hogy a hemoglobin pszeudoperoxidáz hatását csökkentsük. Az immunhisztokémiai jelölést 0.05 % (w/v) 3-amino-2-etil-karbazol kromogént (Sigma) és 0.01 % (v/v) H₂O₂-t tartalmazó 0.2 M Na-acetát pufferben (pH=4.6) hívtuk elő. A pozitív reakciót jellegzetes piros színű csapadék megjelenése kísérte. Az előhívást mikroszkóposan

ellenőriztük, majd a megfelelő erősségű reakció kialakulása után (fagyasztott metszeteknél egy-öt perc, archivált metszeteknél öt-tizenöt perc) a reakciót desztillált vízzel állítottuk le.

A szövettani metszetek háttérfestése és fedése

A szöveteket bizonyos esetekben Mayer-féle hematoxinben gyengén háttérfestettük, hogy a metszetek szöveti szerkezete jobban kiértékelhető legyen. A desztillált vizes közegből a metszeteket tizenöt-harminc másodpercre a hematoxin oldatba helyeztük, majd csapvizés közegben hagytuk, hogy a lila szín kialakuljon. A metszeteket ezután glicerin-PBS-ben vagy glicerin-zselatinban lefedtük.

Glicerin-PBS	glicerin 90 % (v/v) PBS 10 % (v/v) NaN ₃ 0.1 % (w/v)
--------------	---

Glicerin-zselatin	glicerin 12.5 ml zselatin (Sigma) 2 g fenol 0.25 g
-------------------	--

A szövettani metszetek fényképezése

A mikroszkópos felvételeket Olympus AH-2, Opton Axioplan illetve Leitz Diaplan kutató mikroszkópokkal készítettük Kodak Ektachrom 160, Fuji 64T, Fuji Sensia 100 vagy AGFA CT100-as színes diafilmekre, illetve ILFORD PANF 50 vagy AGFAPAN 25 fekete-fehér papírfilmekre. A nem műfény színes diafilmek esetében a műfény sárgító hatásának ellensúlyozására erős kék szűrést alkalmaztunk. A fekete-fehér filmek esetében a jobb kontraszthatás elérésének érdekében zöldes-sárga szűrőt használtunk.

4.9. Az immunreagensek előállítása és tesztelése

Antiszérum előállítása és tesztelése

A fiatal házinyulak immunizálására az alábbi immunizálási protokollt használtuk.

0. hét 1.nap	vérvétel a szélső fülvenából és preimmunszérum készítés
1. hét 1., 3., 5. nap	alkalmanként 50-100 µg PBS-ben feloldott antigén szubkután oltása komplett Freund-adjuvánsban
3. hét 1., 3., 5. nap	alkalmanként 50-100 µg PBS-ben feloldott antigén szubkután oltása 10 % komplett és 90 % inkomplett Freund-adjuvánsban
4. hét 5. nap	próbavérvétel a szélső fülvenából, szérum készítés és a próbavér szérum tesztelése
7. hét 1., 3., 5. nap	alkalmanként 50-100 µg PBS-ben feloldott antigén szubkután oltása inkomplett Freund-adjuvánsban
8. hét 5. nap	próbavérvétel a szélső fülvenából, szérum készítés és a próbavér szérum tesztelése

ha nem elég magas a titer az előző két lépés ismétlése

9. hét 1. nap	a nyúl túlaltatása kloroformmal és elvéreztetése (szív-punkcióval), szérumkészítés, a szérum tesztelése
---------------	---

Az oltásokhoz az antigént 500 µl PBS-ben hígítottuk, majd 500 µl Freund-adjuvánnssal emulziót készítettünk. Az 1 ml emulziót a nyúlban 50-100 µl-enként a hát különböző tájékaira oltottuk.

A vérből úgy készítettük szérumot, hogy a vért szobahőmérsékleten hatvan percig alvasztottuk. Az alvadékat óvatosan eltávolítottuk az edény falától, és 4°C-on tizenkét-tizenhat órán keresztül hagytuk összehúzódni. Az alvadt vér alól a szérumot leszívtuk, és 250 g-vel történő centrifugálással a szérumban található sejtes elemeket kiülepítettük. A szérumokat mélyhűtőben vagy 0.1 % NaN₃-dal tartósítva 4°C-on tároltuk.

A szérumokat rutinszerűen ELISA segítségével teszteltük. Megfelelő titerűnek akkor ítéltünk egy szérumot, ha az a mintahelyekhez kötött antigént legalább háromezerszeres hígításban felismerte. A nyúl elvéreztetése előtt az utolsó próbavérből készített szérumot az ELISA-n kívül más olyan módszerrel is teszteltük, amelyre a szérumot a későbbi kísérletekben rutinszerűen használni akartuk.

Az ellenanyag-preparátumok immunglobulin frakciójának affinitás-tisztítása

Az ellenanyagokat a mAb-Trap (Pharmacia) kit segítségével tisztítottuk. A megfelelően előtisztított ellenanyag-preparátumot (mEa felülúszó, aszcitesz vagy nyúlászérum) a ProteinG-Sepharose 4B oszlopon engedték át, majd a ProteinG-hez nem kötődő fehérjéket nagy térfogatú PBS-sel lemostuk az oszlopról. A ProteinG-hez kötődő immunglobulin frakciót 0.1 M glicin/HCl (pH=2.7) pufferrel eluáltuk. Az eluátum savas pH-ját 1/10 térfogatú 1 M Tris/HCl (pH=9.0) oldattal semlegesítettük. Az elúció hatékonyságát az eluált frakciók OD₂₈₀ mérésével követtük. Az ellenanyagokat PBS-sel szemben éjszakán át dilaizáltuk. Az oszlopot nagy térfogatú 0.1 M glicin /HCl (pH=2.7) pufferrel regeneráltuk és 20 %-os etanolban tároltuk

Az ellenanyag preparátumok ligandspecifikus frakciójának affinitás-tisztítása

Az immunizáláskor kapott szérumok nemcsak az immunizáláshoz felhasznált fehérjéket felismerő ellenanyagokat tartalmaznak, hanem természetes ellenanyagokat is, amelyek az élőlény természetes immunfolyamatainak eredményeképpen képződnek. Ezek a természetes ellenanyagok a legtöbb kísérleti rendszerben nem kívánt műtermékekhez vezethetnek, ezért eltávolításuk a kísérleti rendszerekből kívánatos. Az egyes ellenanyagok affinitás-tisztítását olyan affinitásmátrixon végeztük el, amelyhez az immunizáláshoz használt antigént vagy haptént kapcsolunk.

A p.aCD43(352-372) anti-peptid szérum affinitás-tisztításánál a megfelelő előszűrések után a szérum hordozó fehérjét felismerő ellenanyag tartalmát először egy BSA-Sepharose 4B oszlopon kimerítettük. Az oszlopról a BSA-t felismerő ellenanyagokat eluáltuk, és az p.aBSA affinitásszérumot a további kísérletekben kontrollként használtuk. A BSA-val kimerített szérum CD43(352-372) peptidet felismerő frakcióját (p.aCD43(352-372) szérum) ezután egy CD43(352-372) peptiddel konjugált Sepharose 4B oszlopon tisztítottuk.

Az aCD43cp rekombináns fehérje immunizálásával nyert szérum affinitás-tisztításánál a megfelelő előszűrések után a szérum GST-t és egyéb bakteriális fehérjéket felismerő részét először egy GST-t túltermelő E.coli BL21-lizátummal konjugált Sepharose 4B oszlopon kimerítettük. Az oszlopról az ellenanyagokat eluáltuk, és a p.aE.coli-GST affinitásszérumot a további kísérletekben kontrollként

használtuk. Az így kimerített szérum CD43cp-t felismerő frakcióját (p.aCD43cp szérum) ezután egy GST-CD43cp-t túltermelő E.coli BL21-lizátummal konjugált Sepharose 4B oszlopon tisztítottuk.

A szérumok affinitás-tisztításánál az egyes frakciók immunglobulin tartalmának tisztaságát SDS-PAGE-sel, mennyiségét a gyűjtött frakciók OD₂₈₀ mérésével, míg a tisztított ellenanyag-frakciók specificitását ELISA-val határoztuk meg.

Az affinitás-tisztítási lépések során *Az ellenanyag-preparátumok immunglobulin frakciójának affinitás-tisztítása* alcím alatt leírt módon mostuk az oszlopokat, végeztük a kötődő ellenanyagok elúcióját, semlegesítettük az eluátumok pH-ját és regeneráltuk az oszlopokat. Az affinitásoszlopokat 0.1 % (w/v) NaN₃ tartalmú PBS-ben tároltuk.

Az ellenanyagok biotinizálása

Az ellenanyagokat éjszakán át PBS-sel szemben dializáltuk, hogy az esetlegesen jelen lévő aminocsoport tartalmú molekulákat (pl. Tris) eltávolítsuk. 1 mg affinitás-tisztított immunglobulinhoz 200 ng szulfoszukcinimidil-6-(biotinamido)- hexanoátot (Pierce) adtunk. A biotinizáció hatvan percig zajlott 4 °C-on. Az el nem reagált biotinszármazékot 5 mg lizin (Sigma) hozzáadásával semlegesítettük, majd az elegyet éjszakán keresztül dializáltuk PBS-sel szemben. A biotinizálás hatékonyságának ellenőrzésére alkalmazott módszert a biotinizálandó ellenanyag felhasználási területének függvényében választottuk ki.

5. Eredmények és az eredmények megbeszélése

5.1. A szarvasmarha fehérvérsejt-felszíni epitópokat felismerő monoklonális ellenanyagokkal (mEa-okkal) szerzett tapasztalatok

5.1.1. A felhasznált monoklonális ellenanyagok

Csoportunkban több olyan monoklonális ellenanyag készült, amely a mediterrán országokban fontos gazdasági szerepet játszó házi bivaly különböző sejtfelszíni fehérvérsejt-antigénjeinek extracelluláris epitópjaihoz kötődik (Kurucz és tsi.). Indirekt immunfluoreszcenciás kísérletekben bizonyítottuk, hogy ezen ellenanyagok tekintélyes hányada a házi bivallyal szoros rokonságot mutató szarvasmarha fehérvérsejtjeit is felismeri. Mivel az általunk előállított ellenanyagok száma (22) a további kísérletekhez alacsonynak tűnt, ellenanyagainkat más laboratóriumokban előállított, szarvasmarha-fehérvérsejt-antigénekkal együtt a “Third International Workshop on Ruminant Leukocyte Antigens” keretében vizsgáltuk tovább (Naessens és Hopkins 1996). Valamennyi vizsgált monoklonális ellenanyagot hasonló megközelítéssel állították elő: valamely kérődző állatfajból származó fehérvérsejt-szuszpenziókkal egereket immunizáltak, és az egerben az immunizálás hatására létrejött, az immunizálásra felhasznált fehérvérsejt-szuszpenzió sejtjein található extracelluláris epitópokat felismerő B-limfocitaklonokat immortalizáltak. Kísérleteinkben ezen immortalizált klónok által termelt ellenanyagok között olyanokat kerestünk, amelyek egyrészt felhasználhatók NPF-nal rögzített paraffinba ágyazott szarvasmarha nyirokszövetek immunhisztokémiai festésére, másrészt az állatfajok szélesebb körében ugyanazt vagy hasonló antigént ismernek fel.

5.1.2. Rögzített szövettani metszeteken alkalmazható mEa-ok

Szarvasmarhák nyirokcsomó- és lépdarabjait NPF-ban rögzítettük és paraffinba ágyaztuk, majd a szervekből készült metszeteken különböző epitóp visszanyerési módszerek után immunhisztokémiai festést végeztünk a “Third International Workshop on Ruminant Leukocyte Antigens” által biztosított mEa-okkal.

A háromszázöt vizsgált ellenanyag közül harmincnyolc mEa adott jól értékelhető festődési mintázatot archivált szöveteken (II/A. táblázat). Tapasztalataink szerint az immunhisztokémiai festést megelőző epitóp visszanyerési módszerek alapvetően befolyásolták a kapott festődés minőségét (II/B. táblázat). Bár az ellenanya-

A.		B.			C.	
Monoklonális antitest neve	specifitása	Epitóp visszanyerés			Immunhisztokémiai reakció NPF-nal rögzített szarvasmarha metszeteken	
		nincs	renat.	prot.	Nyirokcsomó	lép (fehér pulpa)
4C7	(NL)	+	++	++	E+, End.+, Me.: velőköteg M \bar{R} +	E+, End+
ANA8	WC15 (NL)	++	++	++	E+	E+
BAQ90	WC1 (T)	+	-	-	Pc.,Me.:sz.L+/-	nem vizsgáltam
Bo42	CD45R (NL)	+	+	-	Fo.:B+, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+, sz.M?+	nem vizsgáltam
Buf13	WC13 (NL)	+/-	+	++	sp.End.+ (arteriolák és venulák)**	sp. End.+ (arteriolák és venulák)**
Buf32	(NL)	-	-	+	sp.End.+ (arteriolák és venulák)**	nem vizsgáltam
CACT83	CD4? (T)	+	-	-	Pc.,Me.:sz.L+	nem vizsgáltam
CACTB32	WC1 (T)	+	-	-	Pc.,Me.:sz.L+	nem vizsgáltam
CACTB44	(M)	+	+	++	Pc., Me.: granulocita +**	Mz.: granulocita +**
CACTB51	(NL)	+	+	- (ht)	Fo.:B+, Pc.:T+, Me.:L+, sz.M+	Fo.: B+, Tz.: T+, Mz.: L+, sz.M?+
CACTB81	TCR $\gamma\delta$ (T)	+	-	-	Pc.,Me.:sz.L+	nem vizsgáltam
CH138	(NL)	+	(ht)	++	matrix + a folliculusok körül**	matrix + a folliculusok körül**
DH16	(NL)	+/- (ht)	+ (ht)	+ (ht)	Fo.:nagy L +, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+	Fo.:nagy L+, Tz.:sp.T+, Mz.:sp.L+
DM6	(B)	+	+	++	Fo.:FDC+, B+/-, Me.:L+, sz.DC?+/-	Fo.:FDC+, B+, Mz.:sp.L+, M?+
DM7	(B)	+/-	+	++	Fo.:FDC+, B?+, Pc., Me.:L+	Fo.:FDC+, B?+, Mz.:L+
Du2-74	(B)	- (ht)	-	+	Fo.:FDC+, B?+/-	Fo.:FDC+,B?+/-
IAH-CC17	CD5 (T)	+/-	-	+	Fo.:sz.L+/-, Pc.:T+	Fo.:sz.L+/-, Tz.: T+
IAH-CC57	WC5 (B)	-	+/-	+	Fo.:FDC+, B?+/-	Fo.:FDC+, B?+/-
IAH-CC76	CD45 (NL)	+	++	-	Fo.:B+, Pc.:sp.T+, Me.: sp.L+, sz.M?+	Fo.:B+, Tz.:sp.T+, Mz.:sp.L+
IAH-CC188	WC1 (T)	+	-	-	Pc.,Me.:sz.L+	Mz.:sz.L+
IL-A115	(NL)	+/- (ht)	+ (ht)	+ (ht)	Fo.:sz.L+, Pc.:sp.T+, Me.:sp. L+	Tz.:sz.T+/-, Mz.:sz.L+/-
IL-A150	CD45RO (NL)	+/-	+	-	Fo.:sp.L+, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+	Tz.: sp.T+/-
IVA12	(T)	+/- (ht)	+	- (ht)	Fo.:sz.L+, Pc.:sp.T+, Me.:sp. L+	Fo.:sz.L+, Tz.:T+, Mz.:sp.L+
IVA20	CD45? (NL)	+	+	-	Fo.:B+, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+	nem vizsgáltam
IVA40	CD45? (NL)	+	+	-	Fo.:B+, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+	Fo.:B+, Tz.:sp.T+, Mz.:sp.L+
IVA84	WC1 (T)	++	-	-	Pc.,Me.:sz.L+	Mz.:sz.L+
IVA95	CD45R (NL)	++	+	-	Fo.:B+, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+	Fo.:B+, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+
IVA103	CD45R (NL)	+	++	-	Fo.:B+, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+, sz.M?+	nem vizsgáltam
IVA112	CD45R (NL)	++	+	-	Fo.:B+, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+, sz.M?+	Fo.:B+, Tz.:sp.T+, Mz.:sp.L+
IVA313	CD45R (NL)	+	++	-	Fo.:B+, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+, sz.M?+	Fo.:B+, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+
IVA352	CD45R (NL)	+	++	-	Fo.:B+, Pc.:sp.T+, Me.:sp.L+, sz.M?+	nem vizsgáltam
IVA373	CD45R (NL)	+/-	+	-	Fo.:B+/-, Pc.:sp.T+/-, Me.:sp.L+/-	nem vizsgáltam
LCT2	(B,T)	+	+	+/-	Fo.: B+/-, Pc.: sp. T+	Fo.: B+/-, Tz.: sp.T+
LCT27	CD45R? (NL)	++	++	+	Fo.kö.:B+, gc.sz.:L+, Pc.,Me.:sp.T+	Fo.kö.:B+, Tz.:sp.T+, gc.,Mz.:sz.L+
SC-6	WC1 (T)	+	-	-	Pc.,Me.:sz.L+/-	nem vizsgáltam
TD4	(B)	+/-	+	?	néhány Fo.gc.: FDC+, sp.B+	nem vizsgáltam
VPM36	MHC II (NL)	+ (ht)	+ (ht)	+ (ht)	Fo.:B+, Pc.: DC+, Me.: sp.L+	Fo.:B+, Mz.:sp.L+
VPM54	MHC II (NL)	+/- (ht)	+ (ht)	+ (ht)	Fo.:B+, Pc.: DC+, Me.: sp.L+	Fo.:B+, Mz.:sp.L+

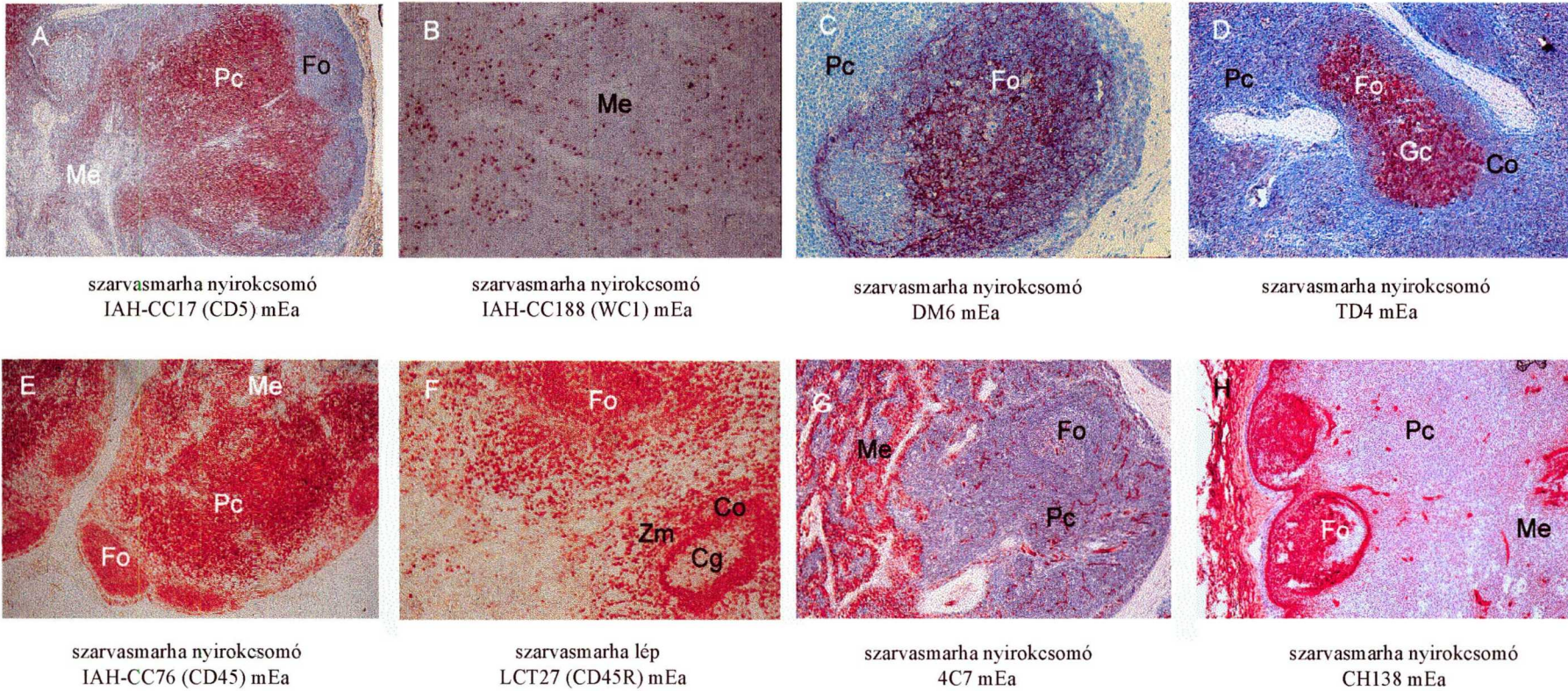
II.A. Az ellenanyagok specificitása a IIIrd International Workshop on Ruminant Leukocyte Antigens alapján
T- T-sejtes, B - B-sejtes, NL mieloid és limfoid sejteken is megjelenő (non-lineage), M mieloid

II.B. renat.: renaturációs technika (mikrohullámú sütő), prot.: proteolitikus emésztés (0,1% pronáz)
-: nincs reakció, vagy a festődési mintázat nem nyilvánvaló +/-: reakció gyenge vagy változó, +: jól kiértékelhető reakció, ++: erős reakció, ht: erős háttér. Az optimális epitóp visszanyerési körülmények vastagon jelölve. *: néhány esetben nem azonosított elszórt sejtek festődése megfigyelhető
**: Az áramlási citometriás eredményeknek ellentmondó vagy a fagyasztott metszeteken tapasztalt mintázattól eltérő festődés.

II.C. Fo.: folliculus, Fo.kö.: folliculáris köpeny, gc.: centrum germinativum, Pc.: paracortex Me.: medulla, Tz.: T-sejtes zóna a lépben, Mz.: marginális zóna, B: B-limfociták, T: T-limfociták, L: limfociták, M: monociták, DC: dendritikus sejtek, FDC: folliculáris dendritikus sejtek, M \bar{R} : makrofágok, End.: endothel, E: vörös vértestek, sz.: elszórt sejtek (<20%), sp.: a sejtek határozott szubpopulációja (<70%)
+: egyértelmű festődés, +/-: gyenge festődés, ?: bizonytalan vagy nem reprodukálható festődés

3. ábra

Neutrális pufferelt formalinnal rögzített paraffinba ágyazott szövettani mintákon alkalmazható szarvasmarha fehérvérsejt antigénekkal reagáló monoklonális ellenanyagokkal kapott festődési mintázatok szarvasmarha nyirokszöveteken



A-D,G,H: háttérfestés Mayer féle hematoxilinnel, E,F: nincs háttérfestés

Fo: folliculus, Co: corona (follikuláris köpeny), Cg: centrum germinativum, Zm: zona marginalis, Pc: paracortex, Me: medulla

gok egy kisebb részénél (pl. ANA8, VPM36) az előkezeléstől függetlenül többé-kevésbé egyforma erősségű reakciót kaptunk, a festődésben legtöbbször mennyiségi (pl. Buf13, DM7, VPM54, stb.) vagy minőségi különbségek mutatkoztak (pl. WC1-et felismerő ellenanyagok, CD45-öt felismerő ellenanyagok, stb.). Amíg a WC1 ellenanyagok esetében előkezelésre nem volt szükség, addig a CD45 ellenanyagok zöménél a nedves hővel történő renaturáció, a DM6 és DM7 ellenanyagok esetében pedig a proteolitikus emésztés tette a jelölődést határozottá. Eredményeink arra utalnak, hogy nem jelölhető ki egy minden egyes ellenanyag esetében jó eredménnyel használható epitóp visszanyerési módszer, hanem az előkezelés a felismerni kívánt epitóp függvényében választható ki.

A festődési mintázatokat (II/C. táblázat) minden esetben összehasonlítottuk a Workshop keretében végzett előzetes áramlási citofluorimetriás mérések eredményeivel és a fagyasztott metszeteken kapott festődési mintázatokkal, hogy a hamis reakciókat kiküszöböljük (az adatokat nem mutatom be). Néhány nyilvánvaló kivételtől eltekintve (lásd II/C táblázat *-gal jelölt festődési mintázatok), az esetek többségében a három különböző kísérleti rendszerben kapott eredmények hasonlóak bizonyultak.

A nyirokszövetek elsősorban T-sejtes területeit felismerő ellenanyagok

A CD5-öt felismerő IAH-CC17 mEa, akárcsak a p.aCD3 ϵ (177-190) szérum (lásd 5.2. fejezet) a nyirokszövetek T-sejtes területeit jelölte (3A. ábra). Feltételezhető, hogy a mEa-gal kapott, részben citoplazmatikusan festődő sejtek zöme T-limfocita, bár az előzetes áramlási citometriás kísérletek alapján néhány B-limfocita festődése nem kizárható.

Az IL-A115 és az IVA12 mEa-ok a folliculáris köpeny és a centrum germinativum között elhelyezkedő, feltételezhetően T-sejt eredetű limfocita csoportot és a T-sejtes zónákban elhelyezkedő limfociták egy részét jelölik. Az IL-A115 ellenanyag a lép vörös pulpájában a vérlemezkéket is felismeri, ami az IL-A115 és az IVA35 ellenanyag által felismert epitópok különbözőségére utal.

A $\gamma\delta$ TCR-t hordozó T-sejtekre jellemző WC1 molekulát felismerő ellenanyagok (BAQ90, CACT83, CACTB32, CACTB81, IAH-CC188, IVA84, SC6) a T-sejtes területeken elszórtan elhelyezkedő limfocitákat jelöltek (3B. ábra). Érdekes, hogy a WC1 molekulát felismerő mEa-ok ilyen nagy számban szerepeltek a NPF-ban

rögzített paraffinba ágyazott metszeteken alkalmazható ellenanyagok között. A WC1 fehérje sejten kívüli szakasza tizenhét (potenciális) glikozilációs helyet tartalmaz (Wijngaard és tsi. 1992). A nagy fokú glikoziláció a molekula bizonyos epitópjait megvédheti a rögzítés és a beágyazás káros hatásaitól.

A nyirokszövetek elsősorban B-sejtes területeit felismerő ellenanyagok

Az MHC II fehérje invariábilis epitópjait felismerő VPM36 és VPM54 voltak az egyedüli olyan mEa-ok, amelyek a B-sejteket egyértelműen felismerték. Ezek az ellenanyagok azonban nemcsak a B-limfocitákat, hanem a mieloid sejtek egy részét is jelölték. Az ellenanyagok rutin alkalmazását a nehezen értelmezhető festődési mintázat mellett az is nagy mértékben megnehezíti, hogy mindkét ellenanyag erős háttérrel ad.

A Du2-74, DM6, DM7 és IAH-CC57 mEa-ok az előzetes áramlási citometriás kísérletekben a fehérvérsejtek közül kizárólag B-limfocitákat ismertek fel. A vizsgált nyirokszövetekben a folliculáris dendritikus sejtek erős festődése (3C. ábra) miatt a B sejtek jelölődésének erősségét nehezen tudtuk megítélni. A DM6 és DM7 ellenanyagok extrafolliculáris limfocitákkal is reagáltak, ami arra utalt, hogy ez a négy ellenanyag legalább két különböző antigént ismer fel.

A TD4 mEa által felismert antigén nagyon sajátos kifejeződési mintázatot mutatott (3D. ábra), ugyanis amíg a folliculusok egy része egyáltalán nem festődött, addig a folliculusok másik részében a centrum germinativum blasztoid sejteinek egy része erősen jelölődött. Ez az érdekes festődési mintázat a felismert antigén különleges szerepére utalhat.

A nyirokszövetek T- és B-sejtes területeit egyaránt felismerő ellenanyagok

A CD45 fehérje valamennyi izoformáján megtalálható közös epitópokat felismerő Bo42, IAH-CC76, IVA20, IVA40, IVA103, IVA112, IVA313, IVA352 és IVA373 mEa-ok valamennyi B-sejtet, a T-sejtek zömét és néhány mieloid sejtet is jelöltek rögzített szövettani metszeteken (3E. ábra). Az előzetesen ugyancsak CD45 közös epitópjával reagáló ellenanyagként jellemzett CACTB51 mEa ugyanakkor a nem-hematopoetikus sejteket is felismerte. Ez az ellenanyag más epitóp visszanyerési körülmények között adott optimális reakciót, mint a CD45 közös epitópjait felismerő ellenanyagok, ami ugyancsak a felismert antigének különbözőségére utal.

Két mEa a CD45 izoforma specifikus epitópját ismerte fel. Az LCT27 mEa által felismert epitóp a folliculáris köpeny B-sejtjein és a T-sejtes zóna limfocitáinak egy részén volt jelen (3F. ábra). Érdekes, hogy pronáz előkezelés után a T-sejtes területeken észlelt festődés megszűnt, míg a folliculáris köpeny B-sejtjei továbbra is gyengén jelölődtek. Ehhez hasonló jelenséget néhány humán CD45R ellenanyagnál is leírtak (Parravicini és tsi. 1987). A csak a hematopoetikus sejtek kis alcsoportján kifejeződő CD45RO izoformát felismerő IL-A150 ellenanyag a várakozásoknak megfelelően csak egy részletesen nem jellemzett limfocita-alcsoportot festett.

Feltűnő, hogy mind az emberi (Linder és tsi. 1987a), mind a szarvasmarha CD45 epitópokat felismerő ellenanyagok nagy számban szerepeltek a NPF-ban rögzített paraffinba ágyazott szöveteken alkalmazható reagensek között. A jelenség feltételezhetően azzal magyarázható, hogy a rögzített szövettani mintákon felhasználható CD45 ellenanyagok olyan részben oligoszacharid jellegű epitópokat ismernek fel az erősen glikozilált CD45 fehérjén, amelyek nem tartalmaznak szabad aminos csoportokat, és ezáltal védettek a formaldehid keresztkötő hatásától (Linder és tsi. 1987b).

Nem-limfoid szöveti komponenseket felismerő ellenanyagok

A már korábban ismertetett MHC II-t felismerő ellenanyagok (VPM36 és VPM54) monocitákat, makrofágokat és egyéb mieloid sejteket is jelöltek a vizsgált nyirokszövetekben. A CACTB44 ellenanyag a limfoid szövetekben elszórtan és kis számban elhelyezkedő granulocitákat festette. A 4C7 ellenanyag egy, a vörösvértesteken és a vaszkuláris endothel sejteken egyaránt kifejeződő antigénhez kötődött (3G. ábra). Az ellenanyag a vörösvértesteket az előregedett vörösvértestek szervezetből történő eltávolítására szakosodott makrofágok (nyirokcsomó velőköteg makrofágjai és a lép vörös pulpa makrofágjai) fagolizozómáiban is felismerte. Az ANA8 ellenanyag kizárólag a vörösvértestekkel reagált, de az általa felismert epitóp a fagocitált vörösvértestekről hiányzott. Ez az ANA8 és 4C7 ellenanyagok által felismert epitópok különbözőségére utal. A Buf13 (WC13) és Buf 32 ellenanyagok az arteriolák és venulák endothel sejtjeit ismerik fel rögzített szöveteken, míg a CH138 ellenanyag a limfoid szervek felépítésében szerepet játszó mátrix fehérjét (3H. ábra).

5.1.3. A mEa-ok által felismert epitópok jelenléte a különböző állatfajokban

A háromszázöt, a “Third International Workshop on Ruminant Leukocyte Antigens” által rendelkezésünkre bocsátott mEa reaktivitását indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel vizsgáltuk a szarvasmarha, a házi bivaly, a juh, a kétpúpú teve, a sertés és az ember perifériás vérének mononukleáris sejtjein. A szarvasmarha-fehérvérsejteket felismerő ellenanyagok közül 69 % reagált a házi bivaly, 32 % a juh, 21 % a kétpúpú teve, 15 % a sertés és 13 % az ember fehérvérsejtjeivel. Az adatokból látható, hogy a szarvasmarhához viszonyított közelebbi rokonsági fokhoz az epitópok nagyobb mértékű szerológiai keresztreakciós gyakorisága társul. Az egyes fajok fehérvérsejtjein kapott keresztreakciók százalékos aránya tehát jól tükrözte a vizsgált fajok szarvasmarhához viszonyított fejlődéstani helyzetét.

A fehérvérsejtek fényszórási tulajdonságai alapján azonosítottuk az előző kísérletekben a hat vizsgált faj mindegyikének fehérvérsejtjeit felismerő tíz ellenanyag által jelölt fehérvérsejt-típusokat (limfociták, monociták, granulociták) szarvasmarhában, sertésben és emberben (III/A. táblázat). A tíz ellenanyag által felismert antigének minden esetben azonos, vagy egymáshoz nagyon hasonló sejt típusokon fejeződtek ki az általunk vizsgált három fajban, sőt egy német csoporttólünk független eredményei alapján a kutyában is (Schubert és tsi. 1996). Míg az ellenanyagok egy része (Bufl, DH59, IVA35, Fw3-181 és TH17) az SDS PAGE során denaturálódott antigént nem ismerte fel, néhány ellenanyag esetében (25-32, DH16, Fw4-101, VPM36) Western blot kísérletek segítségével sikerült az ellenanyagok által felismert szarvasmarha, sertés és emberi fehérjék molekulásúlyát is meghatározni (III/B. táblázat). E négy ellenanyag a különböző vizsgált fajokban hasonló molekulásúlyú antigéneket ismert fel. Az egyes ellenanyagok esetében a különböző állatfajokban észlelt reaktivitás tehát azonos sejtpopulációkra és nagy valószínűséggel azonos – de legalábbis hasonló – molekulásúlyú antigénekre korlátozódik, ami a keresztreakció specificitására és a felismert antigén nagy fokú állandósultságára utal.

III. táblázat

A sertés, kutya és ember fehérvérsejtjeivel keresztreagáló szarvasmarha fehérvérsejt felszíni antigéneket felismerő monoklonális ellenanyagok részletes jellemzése

A.		B.							
Monoklonális ellenanyag neve	specifitása	Szarvasmarha*		Sertés*		Kutya**		Ember*	
		Fvs. pop.	Mol. súly.	Fvs. pop.	Mol. súly.	Fvs. pop.	Mol. súly.	Fvs. pop.	Mol. Súly.
25-32	CD44 (NL)	L,M,G	86 kD	L,M,G	86 kD	L,M,G	n.a.	L,M,G	83 kD
B18	Tapa1 (NL)	L,M,G	n.a.	L,M,G	n.a.	sp.L, M	n.a.	sp.L, G	n.a.
Buf1	CD44 (NL)	L,M,G	n.r.	L,M,G	n.r.	L,M,G	n.a.	L,M,G	n.r.
DH16	(NL)	sp.L, G	214 kD	L,G	236 kD	sp.L,G,M	n.a.	sp.L,G	n.r.
DH59	(M)	M,G	n.r.	M,G	n.r.	M,G	n.a.	M,G	n.r.
Fw3-181	MHC I.?	L,M,G	n.r.	L,M,G	n.r.	L,M,G	n.a.	L,M,G	n.r.
Fw4-101	CD29 (NL)	L,M,G	124 kD	L,M,G	117 kD	L,M,G	n.a.	L,M,G	116 kD
IVA35	CD11a (NL)	L,M,G	90 kD	n.a.	n.r.	L,M,G	n.a.	sp.L,M,G	n.r.
TH17	(NL)	L,M,G	n.r.	L,M,G	n.r.	L,M,G	n.a.	L,M,G	n.r.
VPM 36	MHC II.	sp.L,M	35 kD	sp.L,M	37 kD	n.a.	n.a.	sp.L	38 kD

III.A. Az ellenanyagok specifitása a Third International Workshop on Ruminant Leukocyte Antigens alapján NL mieloid és limfoid sejteken is megjelenő (non-lineage), M mieloid

III.B. Fvs. Pop. : A fehérvérsejt populációkat a limfociták, monociták és a granulociták jellegzetes fényoszorási (forward scatter és side scatter) tulajdonságai alapján azonosítottuk áramlási citometriás kísérletekben.

n.a. : nincs adat, L: limfociták, M: monociták, G: granulociták, DC: dendritikus sejtek, sp.: a sejtek határozott szubpopulációja (<70%)

Mol.súly.: A látszólagos molekulásúlyokat western blot technika segítségével kíséreltük meghatározni. Ez csak akkor lehetséges, ha az ellenanyag a fehérjét az SDS gélelektroforézis utáni denaturált állapotban is felismeri. n.r.: nincs reakció, n.a.: nincs adat

*A csoportunkban Vilmos Péter által elvégzett kísérletek eredményei

**Irodalmi adatok (Schubert és tsi. 1996)

5.1.4. A mEa-ok alkalmazási lehetőségei a rutin állatorvosi diagnosztikában

A "Third International Workshop on Ruminant Leukocyte Antigens" által rendelkezésünkre bocsátott ellenanyagok közül összeállítható egy olyan panel, amely lehetővé teszi az immunválaszban szerepet játszó sejtek, köztük a B- és T-limfociták, monociták, makrofágok, granulociták és endothel sejtek összességének vagy jól körülírható alcsoportjainak azonosítását a rutin diagnosztikában leggyakrabban használt NPF-nal rögzített paraffinba ágyazott szervekből készült szövettani metszeteken szarvasmarhában.

Az egyes ellenanyagok konkrét diagnosztikai értékét különböző kórképekből származó metszetek immunhisztokémiai festésével lehet megállapítani. A nagy számú reagens ilyen jellegű vizsgálata e munka kereteit meghaladta volna, így a különböző ellenanyagok potenciális diagnosztikai felhasználási területére leginkább az analóg humán ellenanyagok felhasználási területe alapján lehet következtetni. A CD45 ellenanyagoknak mint hematopoetikus sejteket azonosító reagenseknek a szerepe a humán diagnosztikában kiemelkedő jelentőségű (Kurtin és Pinkus 1985). Mivel mikroszkópos szinten elsősorban a különböző limfocita alcsoportok elkülönítése okoz nehézségeket, a rutin diagnosztikában elsősorban a limfocita alcsoportokat felismerő ellenanyagok alkalmazásának elterjedése várható. A rutin állatorvosi patológiában felhasználható WC1 ellenanyagok a $\gamma\delta$ T-limfociták kóroktani szerepének jobb megértéséhez nyújthatnak kiegészítő információkat. A legtöbb limfocita alcsoportot felismerő ellenanyag esetében a potenciális felhasználási területre az analóg humán alkalmazások alapján azonban még nem következtethetünk, mert az ellenanyagok által felismert antigén emberi homológját – azaz az ellenanyagok CD besorolását – még nem sikerült azonosítani.

Megvizsgáltuk, hogy melyek azok az ellenanyagok, amelyek alkalmasak az immunsejtek festésére más, a szarvasmarhától rendszertanilag távol eső fajokban is. Az állandósult epitópokat felismerő ellenanyagok a várakozásnak megfelelően nem vagy csak véletlenszerűen (DH16, VPM36) estek egybe azokkal, amelyek a formaldehiddel rögzített paraffinba ágyazott szövettani metszeteken használhatónak bizonyultak. Az általunk jellemzett ellenanyagok az esetek többségében ezért kizárólag a szarvasmarhában vagy esetleg néhány közeli rokon párosujjú-patás állatfajban használhatók fel rutin diagnosztikai célokra.

5.2. A p.aCD3 ϵ (177-190) szérummal szerzett tapasztalatok

5.2.1. A p.aCD3 ϵ (177-190) szérum

A p.aCD3 ϵ (177-190) egy Mason és tsi. által előállított affinitás-tisztított nyúlszérum, amely a humán CD3 ϵ fehérje 177.-190. aminosavak alkotta, immunogénnek jóvolt szakaszának megfelelő aminosav-sorrendű peptidet (1. ábra) ismer fel. Western blot kísérletekben igazolták, hogy ez a reagens az emberi CD3 ϵ fehérjét is felismeri. Immunhisztokémiai vizsgálatokban a szérum elsősorban a limfoid szövetek T-sejtes területeit jelölte mind natív, mind archivált emberi szövettani metszeteken (Mason és tsi. 1989). A p.aCD3 ϵ (177-190) szérumot kiterjedten használják a szöveteket beszűrő sejtek B- és T-sejt eredetének elkülönítésére.

Az utóbbi években egyre több fajban ismerték meg a CD3 ϵ aminosav-sorrendjét (1. ábra). A munkánk kezdetekor már rendelkezésre álló emberi, egér és kutya CD3 ϵ aminosav-sorrendek összehasonlításakor feltűnt a fehérje citoplazmatikus régiójának magas fokú állandósultsága. Az állandósult fehérjerész kiterjedt a humán CD3 ϵ 177.-190. aminosavait hordozó szakaszára is. Ezért megvizsgáltuk, hogy a különböző fajok CD3 ϵ fehérjei közötti aminosav-sorrend szintjén mutatkozó nagyfokú homológia kimutatható-e a p.aCD3 ϵ (177-190) reagens segítségével szerológiai szinten.

5.2.2. A p.aCD3 ϵ (177-190) szérum által felismert epitópok jelenléte a különböző gerinces állatfajokban

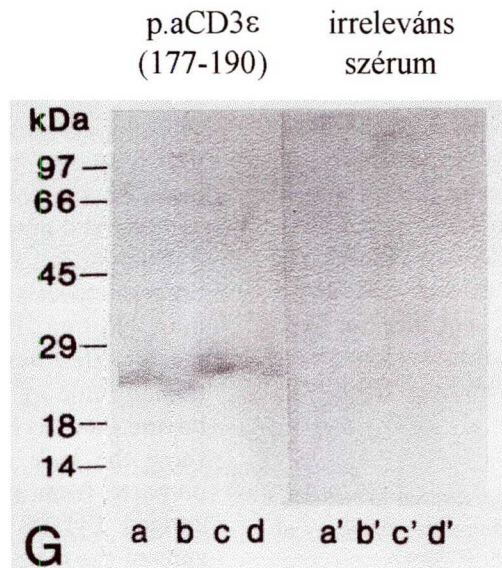
Western blot kísérletekben a p.aCD3 ϵ (177-190) szérum az emberi CD3 ϵ fehérjéhez hasonló, 19-25 kD molekulásúlyú fehérjét ismert fel szarvasmarha, házi bivaly, sertés és házi tyúk nyirokszerveiből készült, SDS-PAGE-sel elválasztott sejtmembrán preparátumban (4A ábra).

A sikeres Western blot kísérletek nyomán különböző rendszertani csoportokba tartozó állatok immunszerveiből fagyasztott, illetve NPF-ban rögzített paraffinba ágyazott metszeteket készítettünk, majd a metszeteket megfestettük p.aCD3 ϵ (177-190), illetve negatív kontrollként p.aChromogranin- α szérummal. A kísérleteinket az alábbi állatfajokból származó mintákon végeztük:

4. ábra

A p.aCD3ε(156-168) szérum felismeri a CD3ε fehérjét sok állatfajban

A.

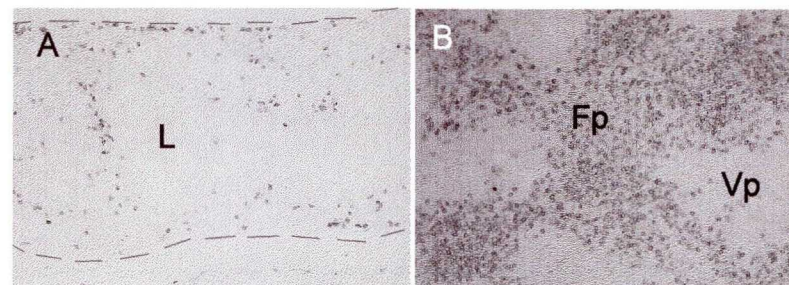


Western blot

membránpreparátumok

- a: humán nyirokcsomó
- b: házi tyúk lép
- c: házi bivaly nyirokcsomó
- d: szarvasmarha nyirokcsomó

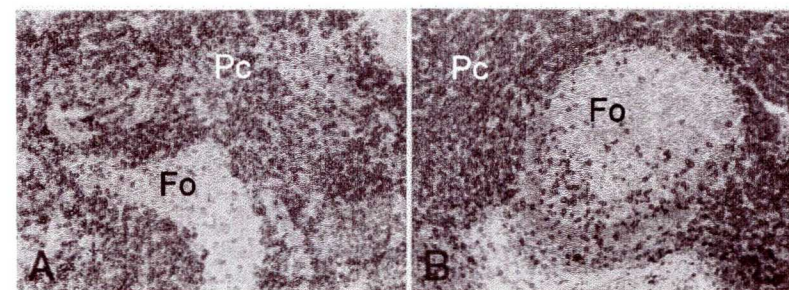
B. neutrális pufferelt formalinnal rögzített paraffinba ágyazott szövetek immunhisztokémiai festése p.aCD3ε(177-190) szérummal



házi tyúk bursa

nagy póling lép

C. fagyasztott (natív) szövetek immunhisztokémiai festése p.aCD3ε(177-190) szérummal



humán nyirokcsomó

szarvasmarha nyirokcsomó

Fo: follikulus, Pc: paracortex, Fp: fehér pulpa,
Vp: vörös pulpa, L: lebeny (bursa)

Halak		ponty - (<i>Cyprinus carpio</i>)
Kétéltűek		ásóbéka - (<i>Pelobates fuscus</i>)
Hüllők		fürge gyík - (<i>Lacerta agilis</i>)
Madarak	Partimadár-alkatúak	nagy póling - (<i>Numenius arquata</i>)
	Tyúkalkatúak	házi tyúk, házi pulyka
	Lúdalkatúak	házi kacska
Emlősök	Ragadozók	kutya, macska, nyérc
	Nyúlalkatúak	házi nyúl
	Párosujjú patások	szarvasmarha, házi bivaly, juh, kecske és sertés
	Páratlanujjú patások	ló
	Rágcsálók	házi egér (<i>Balb/c</i>), házi patkány
	Főemlősök	csimpánz

A p.aCD3 ϵ (177-190) szérum valamennyi vizsgált madár- és emlősfaj immunszerveiben limfocita morfológiájú sejteket ismert fel, míg a hidegvérű állatokban nem kaptunk reakciót. A jelölődés a legtöbb esetben a sejtek membránjára korlátozódott, noha néhány esetben citoplazmatikus festődést is megfigyeltünk.

A vizsgált madárfajokban a szérum a tímusz limfoid sejtjeit és a lép fehér pulpájában elhelyezkedő limfoid sejtek jelentős részét jelölte (4B/A. ábra), míg a Peyer-plakkokban és a Fabricius-féle burzában (4B/B. ábra) csak elszórtan lehetett a szérummal specifikusan festődő sejteket találni. Az emlősfajokban a CD3 ϵ + sejtek alkották a tímusz limfoid sejtjeinek túlnyomó többségét, ezek a sejtek dúsultak fel a lép fehér pulpájában, a periarterioláris hüvelyben és a nyirokcsomók kéreg alatti (paracortex) állományában (4C/A.-B. ábra). A nem-limfoid szövetekben – egy-egy szórványos limfocita jelölődésétől eltekintve – specifikus festődést nem tapasztaltunk.

A felismert fehérje molekulásúlya és sejten belüli elhelyezkedése alapján a p.aCD3 ϵ (177-190) szérum a humán CD3 ϵ -nal homológ fehérjét ismer fel valamennyi vizsgált madár- és emlősfajban. A sejtek szöveti eloszlása alapján úgy tűnik, hogy a jelölődött sejtek túlnyomó többsége T-limfocita, bár irodalmi adatokból ismert, hogy néhány madár- és emlősfajban a természetes ölüsejtek is kifejezik a CD3 ϵ fehérjét.

5.2.3. A p.aCD3 ϵ (177-190) szérum alkalmazási lehetőségei az állatorvosi diagnosztikában

Bebizonyosodott tehát, hogy a CD3 ϵ fehérjét felismerő szérum alkalmas a CD3 ϵ + sejtek (T-sejtek és természetes ölösejtek) kimutatására a madár- és emlősfajokból származó fagyasztott és archivált szövettani metszeteken. Tapasztalataink szerint az archivált szöveteken a p.aCD3 ϵ (177-190) szérum renaturációs módszerek és proteolitikus emésztés után is megfelelő erősségű jelet adott, bár az egyes állatfajok esetében egyik vagy másik előkezelés sokszor hatásosabbnak bizonyult.

Kísérleteink következő szakaszában választ kerestünk arra, hogy a p.aCD3 ϵ (177-190) szérum a különböző állati kórképekben mennyire alkalmas a CD3 ϵ + sejtek kóross eloszlásának vizsgálatára. A Magyar Országos Állategészségügyi Intézet archívumából kiválasztottunk olyan formaldehiddel rögzített paraffinba ágyazott szövettani blokkokat, amelyek madár- és emlősfajok különböző típusú kóreseiből származtak (IV/A. táblázat). Természetesen a kórképek között különös hangsúlyt kaptak azok az esetek, amelyekben a limfociták kóroktani szerepe irodalmi adatok vagy a hagyományos szövettani vizsgálatok alapján valószínűsíthető volt. Lehetőség szerint egy adott kórképet legalább három független kóresetből származó minta elemzése alapján jellemeztünk.

A CD3 ϵ + sejtek kimutatása a különböző kóresetekből származó szövettani mintákban általában sikerrel járt. Ezt azért kell hangsúlyozni, mert egyrészt a szerveket nem a humán gyakorlatban ma már egységesített optimális körülmények között rögzítették és ágyazták be, ami sok minta esetében túlrögzüléshez vezetett, másrészt a minták kora a vizsgálataink időpontjában elérhette a tíz évet.

A mononukleáris sejtek kóros eloszlását az egészséges szövetekben előforduló mononukleáris sejtszámhoz vagy sejteloszlásához viszonyított jelentős eltérésként határoztuk meg (IV/B. táblázat). Bár minden kórkép mutat egyedi jellegzetességeket, a mintákat megkíséreltük betegségtypusok szerint csoportosítani, és az egyes csoportokban észlelt általános CD3 ϵ + sejtminizatot jellemezni (IV/C. táblázat).

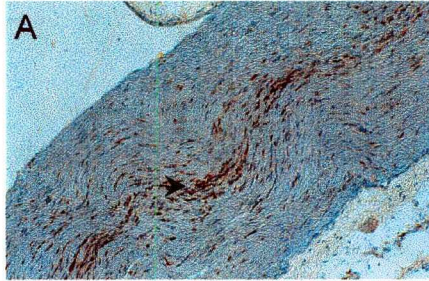
A *virusok* elleni védekezésben a citotoxikus T-sejtek játszanak fő szerepet, amelyek a fertőzött sejteket felismerik és elpusztítják. Nem meglepő tehát, hogy a víru-

A.		B.		C.	D.	
Kórkép	Állatfaj	Kórokozó	Szövet	Kóros elváltozás	CD3ε+ sejtek	CD43+ sejtek
Vírusok okozta kórképek						
Aujeszky betegség (pseudorabies)	sertés	Herpesvirus	agy	enyhe limfocitás perivasculitis	+ (T)	+ (T)
Marek betegség gyulladáshoz vezető forma	házi tyúk	Herpesvirus	agy n. ischiadicus	limfocitás perivasculitis mononukleáris sejtes beszűrődés	++ (T) ++ (T)	n.r. n.r.
Avian encephalomyelitis	házi tyúk	Picornavirus	agy pancreas	limfocitás perivasculitis limfocitás góccok	+ (T) + (T)	n.r. n.r.
Aleuti betegség	nyérc	Parvovirus	máj vese	plazmasejtes beszűrődés plazmasejtes beszűrődés	0 0	n.r. n.r.
Maedi	juh	Retrovirus	tüdő tejmirigy	mononukleáris sejtes beszűrődés mononukleáris sejtes beszűrődés	++ (T) ++ (T)	++ (T) ++ (T)
Kecske arthritis-encephalitis	kecske	Retrovirus	izületi szinovialis membrán vese	mononukleáris sejtes beszűrődés mononukleáris sejtes beszűrődés	++ (T) 0	++ (T) 0
Sendai-vírus pneumonia	patkány	Paramyxovirus	tüdő	mononukleáris sejtes beszűrődés	++ (T)	++ (T)
Nephritis	házi tyúk	Picornavirus	vese	mononukleáris sejtes beszűrődés	+ (T)	n.r.
Proventriculitis	házi tyúk	Ismeretlen	proventriculus	mononukleáris sejtes beszűrődés	++ (T)	n.r.
Baktériumok okozta kórképek						
Salmonellosis	sertés	Salmonella typhi-suis	tüdő belek	mononukleáris sejtes beszűrődés mononukleáris sejtes beszűrődés	+/- (T) +/- (T)	++ (M,T) ++ (M,T)
Actinobacillosis	sz.marha	Actinobacillus lignieresii	nyelv	granulomatózus gyulladás	+ (T)	++ (G,T)
Paratuberculosis	juh sz.marha	Mycobacterium paratuberculosis	belek belek	mononukleáris sejtes beszűrődés mononukleáris sejtes beszűrődés	++ (T) ++ (T)	++ (M,T) ++ (M,T)
Listeriosis	juh	Listeria monocytogenes	agy	leptomeningitis	++ (T)	++ (T)
Leptospirosis	sertés	Leptospira sp.	Vese	mononukleáris sejtes beszűrődés	++ (T)	++ (T)
Mycoplasmosis	sz.marha	Mycoplasma sp.	Tüdő tejmirigy trachea	limfocitás góccok limfocitás góccok limfocitás góccok	++ (T) ++ (T) ++ (T)	++(T,M) ++(T,M) ++(T,M)
Mycoplasmosis	ló	Mycoplasma sp.	Tüdő	limfocitás góccok	++ (T)	++ (T)
Mikózisok						
Aspergillosis	házi kacsa	Aspergillus flavus	agy	granulomatózus gyulladás	0	n.r.
Aspergillosis	sz.marha	Aspergillus flavus	tüdő	granulomatózus gyulladás	0	+ (G,M)
Aspergillosis	sertés	Aspergillus flavus	tüdő	granulomatózus gyulladás	0	+ (M,G)
Cryptococcosis	házi tyúk	Cryptococcus sp.	Larynx & trachea	mononukleáris sejtes beszűrődés	+ (T)	n.r.
Protozoák és paraziták okozta kórképek						
Coccidiosis	nyúl	Eimeria stidae	máj	mononukleáris sejtes beszűrődés	+/- (T)	n.a.
Coccidiosis	házi tyúk	Eimeria tenella	belek	mononukleáris sejtes beszűrődés	+ (T)	n.r.
Encephalitozoonosis	nyúl	Encephalitozoon cuniculi	agy vese	granulomatózus gyulladás mononukleáris sejtes beszűrődés	0 +/- (T)	n.a. n.a.
Tüdő nematoditis	juh	Dictyocaulus filaria	tüdő	mononukleáris sejtes beszűrődés	+/- (T)	+/- (T)
Tüdő nematoditis	kecske	Dictyocaulus filaria	tüdő	mononukleáris sejtes beszűrődés	+/- (T)	+/- (T)
Fehérvérsejt-eredetű daganatos kórképek						
Marek betegség tumoros forma	házi tyúk	Herpesvirus	máj vese	rosszindulatú limfoid tumor rosszindulatú limfoid tumor	++ (T,NK) ++ (T,NK)	n.r. n.r.
Rosszindulatú limfóma	sz.marha	Retrovirus	szív máj	rosszindulatú limfoid tumor rosszindulatú limfoid tumor	0 0	++ (B) ++ (B)
Rosszindulatú limfóma	sertés	Ismeretlen	máj	rosszindulatú limfoid tumor	+ (T)	++ (B,T)
Reticulo-endotheliosis	pulyka	Retrovirus	máj	rosszindulatú limfoid tumor	+ (T)	n.r.
Rosszindulatú limfóma	macska	Retrovirus	nyirokcsomó	rosszindulatú limfoid tumor	++ (T)	n.r.

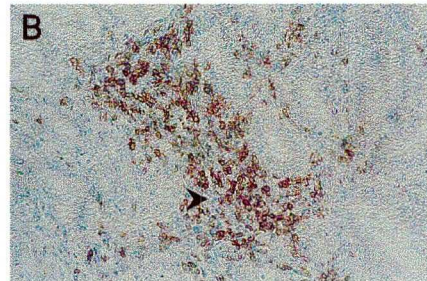
CD3 ε+ sejtek: T: T-sejtek, NK: NK-sejtek, CD43+ sejtek T: T-sejtek, B: éretlen B-sejtek, M: monociták, G: granulociták, n.a. nincs adat, n.r. nincs reakció
A sejtek patológiás beszűrődése: ++ erős, alapvető kóroktani jelentőségű, + mérsékelt vagy kísérő folyamat eredménye, +/- bizonytalan, 0 nincs

sos fertőzésekben a fertőzés helyén nagy mennyiségű CD3ε+ limfocita figyelhető meg elszórva vagy góckban az interstitiumban, súlyosabb esetben pedig magában a szövetekben is (5A-B. ábra). Az invazív *prokarióta kórokozók*kal szemben a szervezet elsősorban opszonizáló ellenanyagok termelésével és az opszonizált baktériumok bekebelezésével védekezik. Az ilyen kóresetekben a gyulladással területeket ennek megfelelően általában CD3ε- neutrofil granulociták és monociták/makrofágok szűrtek be (5C. ábra). Nagyobb számú CD3ε+ limfocitát a mycoplasmosist (5D. ábra), a listeriosist és a paratuberculosist kísérő gyulladással reakciókban figyeltünk meg. Ezen kórokozók mindegyike elleni védekezésben a celluláris immunválasznak kitüntetett szerepe van. A különböző gombafajok által kiváltott kórképeket, a *mycosis*okat rendszerint ugyancsak granulomatózus gyulladással kíséri. Az ilyen mintákban ennek megfelelően CD3ε+ sejteket nem vagy csak kis számban észleltünk. A *protozoák és paraziták* elleni védekezési reakciók nagyon változatosak, és az adott parazitafajtól erősen függő képet mutatnak. A vizsgált ilyen esetekben a CD3ε+ sejtek jelenléte és mennyisége összefüggött a celluláris komponens szerepének jelentőségével az adott parazitafaj ellenes immunválaszban. Bár a gyulladással területeket beszűrő sejtek jellemzése fontos adalékokkal szolgálhat a kórképek fajtájának és súlyosságának a megítéléséhez, a fertőző betegségek diagnosztizálásában a kórokozó kimutatására alapuló módszereknek lesz a jövőben is alapvető szerepe.

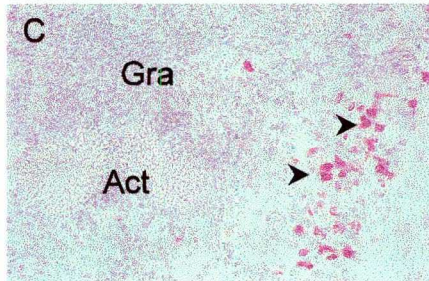
A *limfoproliferatív betegségek és limfoid daganatok* esetében viszont elengedhetetlen a szöveteket beszűrő sejtek pontos jellemzése. A Retrovirus által kiváltott, szarvasmarhákban előforduló rosszindulatú limfómát (limfoid leukóziist) CD3ε- fenotípusú limfoid sejtek alkották, ami összhangban van azokkal az irodalmi adatokkal, amelyek szerint az ilyen daganatok transzformált B-sejteket tartalmaznak (Ferrer és tsi. 1979). Egy ismeretlen eredetű, sertésből származó limfoid tumor ugyancsak CD3ε- fenotípust mutatott, noha a mononukleáris morfológiájú sejtek kb. 1 %-át a p.aCD3ε(177-190) szérum jelölte (5E. ábra). Az ugyancsak ismeretlen eredetű, macska-nyirokcsomóból származó limfoid daganat sejtjei viszont egyértelműen CD3ε+ fenotípusúak voltak. Bonyolultabb képet mutattak a madarakban előforduló Retrovirus okozta reticuloendotheliosis és a Herpesvirus (Marek Disease Virus) okozta Marek-betegség tumoros formái. Mindkét esetben a daganatok nagy mennyiségű és heterogén morfológiájú mononukleáris sejtet tartalmaztak, de amíg az első kórképben a CD3ε-



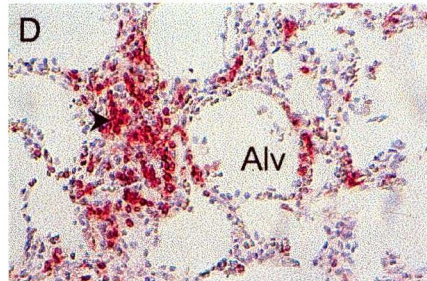
házi tyúk - nervus ischiadicus



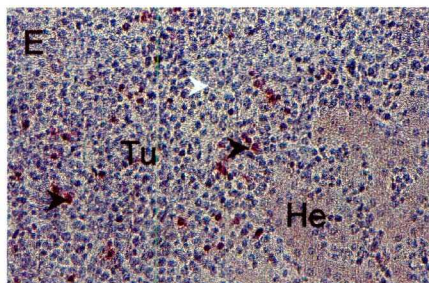
házi tyúk - proventriculus



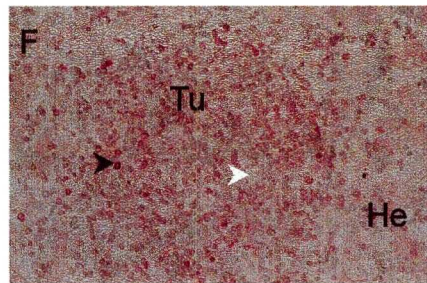
szarvasmarha - ismeretlen szövet



ló - tüdő



sertés - máj



házi tyúk - máj

- A. A Marek betegség (Marek Disease Virus fertőzés) gyulladós formájában elhullott házi tyúk ülőidegéből (nervus ischiadicus) készült metszeten látható, hogy az egyébként egészséges állatokban limfocitákat nem tartalmazó idegrostokat nagy mennyiségű CD3ε+ limfocita szűri be (fekete nyíl).
- B. Azonosítatlan vírus okozta proventriculitisben (mirigyesgyomor gyulladás) elhullott csirke mirigyes gyomrából készült metszeten CD3ε+ sejtek láthatók intersticiálisan, illetve góciókban (fekete nyíl), ami a gyulladás súlyosságára utal.
- C. Az Actinomycosisban elhullott szarvasmarha ismeretlen szövetéből készült metszeten jól láthatók a baktérium álhifái (Act), melyeket nagyobb mennyiségű CD3ε- granulocitákból és monocitákból álló granulóma (Gra) vesz körül. A metszeten a tályog szélén néhány CD3ε+ limfocita is látható (fekete nyíl), aminek a kóroktani jelentősége valószínűleg másodlagos.
- D. Azonosítatlan Mycoplasma faj okozta tüdőgyulladásban elhullott ló tüdejéből készült metszeten látható, hogy az alveólusok (Alv) falai helyenként megvastagodtak, és bennük intersticiálisan, illetve góciókban nagyobb mennyiségű CD3ε+ limfocita látható (fekete nyíl).
- E. Ismeretlen eredetű limfómában elhullott sertés májából készült metszeten látható, hogy a bemutatott régióban már csak nyomokban van ép hepatocita (He), a szövetet nagy mennyiségű tumoros sejt (Tu) szűri be. A tumor limfoid sejtjeinek túlnyomó többsége CD3ε- fenotípust mutat (fehér nyíl), míg jóval kisebb mennyiségben tartalmaz a daganat CD3ε+ sejteket is (fekete nyíl).
- F. A Marek betegség (Marek Disease Virus fertőzés) daganatos formájában elhullott házi tyúk májából készült metszeten látható, hogy a bemutatott régióban már csak nyomokban van ép hepatocita (He), a szövetet nagy mennyiségű tumoros sejt (Tu) szűri be. A tumor limfoid sejtjeinek túlnyomó többsége CD3ε+ fenotípust mutat (fekete nyíl), míg jóval kisebb mennyiségben tartalmaz a daganat CD3ε- sejteket is (fehér nyíl).

sejtek voltak túlsúlyban, addig a Marek-betegség tumorjai főleg CD3ε+ sejtekből álltak (5F. ábra). Ez az eredmény teljesen megegyezik az irodalmi adatokkal, hiszen amíg a reticuloendotheliosis egy B sejt eredetű limfóma, addig a Marek-betegség egy minden limfoid sejtre kiterjedő limfoproliferáció, amely tartalmazhat (és a megvizsgált esetekben tartalmazott) egy vagy néhány ténylegesen transzformált T-sejt eredetű tumoros sejtvonalat (Rouse és tsi. 1973, Sherman és tsi. 1983). Eredményeink alapján látható, hogy a p.aCD3ε(177-190) szérum nem csak az ismert etiológiájú limfoid tumorok jellemzését tette lehetővé, hanem alkalmazásával mód nyílt eddig ismeretlen eredetű daganatok fenotipizálására is.

Felismerésünk aktualitását és a reagens állatorvosi patológiai jelentőségét mi sem bizonyítja jobban, hogy kísérleteinkkel párhuzamosan, vagy a kísérleteinkről nem tudva számos külföldi csoport is leírta e szérum alkalmazási lehetőségeit az állatorvosi patológia különböző területein (Jones és tsi. 1993, Lunney és tsi. 1994, Bertram és tsi. 1996).

5.3. A p.aCD43(352-372) szérummal szerzett tapasztalatok

A CD43(352-372) peptidet a rendelkezésre álló emberi, egér és patkány CD43 aminosavszekvenciák összehasonlítása alapján állandósultnak talált emberi CD43 fehérjeszakasz alapján terveztük meg. A peptidet BSA-hoz konjugáltuk, majd a konjugátummal két nyulat immunizáltunk. A nyúlszérumokat a CD43(352-372) peptiden teszteltük ELISA segítségével (az eredményeket nem mutatom be). Miután háromszori emlékeztető oltás után sem nőtt már jelentősen a szérum CD43(352-372) titere, a nyulakat elvéreztettük, és az anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint a szérumot két lépésben affinitástisztítottuk (az eredményeket nem mutatom be).

Két különböző rendszerben vizsgáltuk, hogy a p.aCD43(352-372) szérum a CD43 fehérjét felismeri-e. Egyrészt kimutattuk, hogy amíg az affinitás-tisztított szérummal permeabilizált CD43- P3HR1 sejtek nem jelölődtek, addig a CD43+ Jurkat sejteken erős és a CD43(352-372) peptiddel dóziszfüggően gátolható membránfestődést kaptunk (az eredményeket nem mutatom be). Másrészt Western blot kísérleti rendszerben bizonyítottuk, hogy a p.aCD43cp szérum és a CD43 sejtfelszíni epitópját kötő T2/53 mEa hasonlóan viselkedett, ugyanis a CD43+ Jurkat sejt vonal SDS-PAGE-sel elválasztott lizátumban mindkét reagens ugyanolyan 135 kD molekulásúlyú fehérjét ismert fel, míg a CD43- P3HR1 sejt vonal SDS-PAGE-sel elválasztott lizátumához egyik ellenanyag-preparátum sem kötődött. A kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy a p.aCD43(352-372) szérum a CD43 fehérje 352.-372. aminosavainak megfelelő szakaszát mind natív, mind denaturált formában felismeri.

A biztató eredmények ellenére ezt a szérumot a további kísérletekben nem tudtuk felhasználni, mert a szérum csak csekély mennyiségű, a CD43 fehérjét felismerni képes ellenanyagot tartalmazott. Már a szérum CD43(352-372) titere is nagyon alacsony volt (kb. 15 μ g p.aCD43(351-372) /ml szérum), amit a peptid alacsony immunogenitásával magyaráztunk. Ráadásul a CD43 fehérjét mind a két vizsgált kísérleti rendszerben csak nagyon magas p.aCD43(352-372) koncentráció (50 μ g/ml) mellett sikerült kimutatnunk, ami arra utalt, hogy a peptidet felismerő ellenanyagok nagy része, bár a peptidhez specifikusan kötődik, a CD43 fehérjét nem ismeri fel. A megközelítés kudarcából okulva úgy döntöttünk, hogy a CD43 fehérje citoplazmatikus részét baktériumban állítottuk elő, és az így előállított fehérjével történő immunizálással nyert szérumot vizsgáljuk tovább.

5.4. A p.aCD43cp szérummal szerzett tapasztalatok

5.4.1. A CD43cp rekombináns fehérje előállítása és tisztítása

A GST-CD43cp fúziós fehérjét kódoló plazmidkonstrukció kialakítása

A teljes CD43 gént tartalmazó genomikus DNS szakaszt hordozó pHF1 plazmidot (6A1. ábra) templátként használva PCR módszerrel sokszorozítottuk a CD43 citoplazmatikus részét kódoló DNS szakaszt. Erre az adott lehetőséget, hogy a CD43 citoplazmatikus doménje egyetlen exonban kódolt. Agaróz gél elektroforézissel igazoltuk, hogy a képződött PCR termék a várakozásunknak megfelelő méretű, kb. 440 bp-os DNS fragment. A PCR terméket ezt követően EcoRI és SacII restriktációs enzimekkel hasítottuk, így a fragment mérete kb. 420 bp-ra csökkent (6A2. ábra).

A hasított PCR terméket EcoRI és SacII restriktációs endonukleázokkal emésztett pBC-SK plazmiddal ligáltuk, majd a ligátumot Sure törzsbe transzformáltuk. A klóramfenikolt tartalmazó szelekciós táptalajon kinövő fehér baktérium-telepekből – amelyek elkülöníthetők voltak a hasított PCR fragmentet biztosan nem hordozó kék színű telepektől – tisztított plazmidokat restriktációs térképezéssel jellemeztük (6B1.-2. ábra).

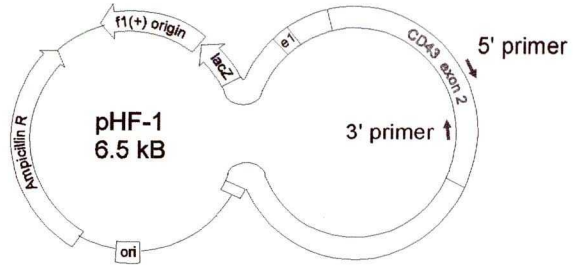
A PCR során alkalmazott Taq polimeráz gyakran helytelen bázispárokat épít be a képződő termékbe, és az ilyen pontmutációkat hordozó klónok a későbbiekben hibás aminosav-sorrendű fúziós fehérje kialakulását eredményezhetik. Ezért a restriktációs endonukleázokkal végzett térképezés során megfelelő szerkezetűnek talált klónok CD43cp-t kódoló részét szekvenáltuk. Óvatosságunk indokoltnak bizonyult, az első három megszekvenált klón ugyanis missense pontmutációt vagy pontmutációkat tartalmazott (az eredményeket nem mutatom be).

A megfelelő bázis-sorrendű CD43cp-t kódoló inzertet hordozó pBC-SK-CD43cp-B1 és a kívánt expressziós vektort tartalmazó pTS1/14.5 plazmidokat EcoRI és SacII enzimekkel hasítottuk, majd a két, megfelelő arányban összekevert hasított terméket ligáltuk. A ligátumot BamHI restriktációs endonukleázzal emésztettük, amely a ligálás során esetlegesen újra képződő pTS1/14.5 konstrukciót linearizálta, és ezáltal megakadályozta a későbbiek során zavaró pTS1/14.5 plazmidot hordozó baktériumok létrejöttét. A BamHI enzimmel emésztett ligátumot Sure baktérium-törzsbe transzformáltuk, majd az ampicillint tartalmazó táptalajon kinövő baktérium-telepekből

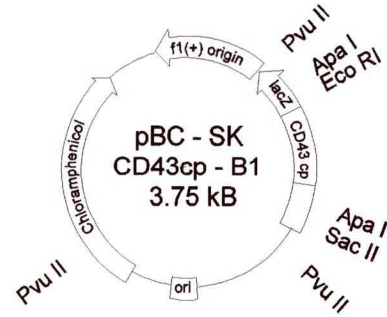
6. ábra

A GST-CD43cp fúziós fehérjét kódoló plazmidkonstrukció létrehozása

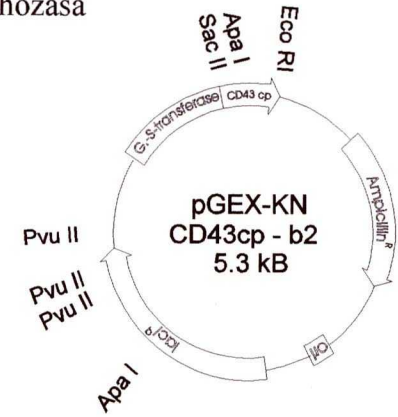
A1.



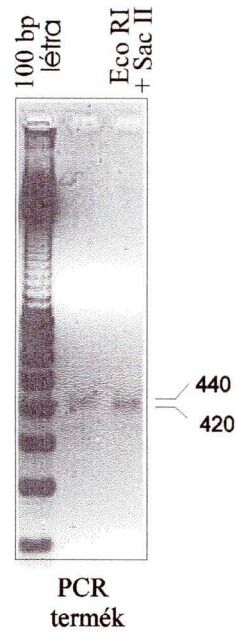
B1.



C1.

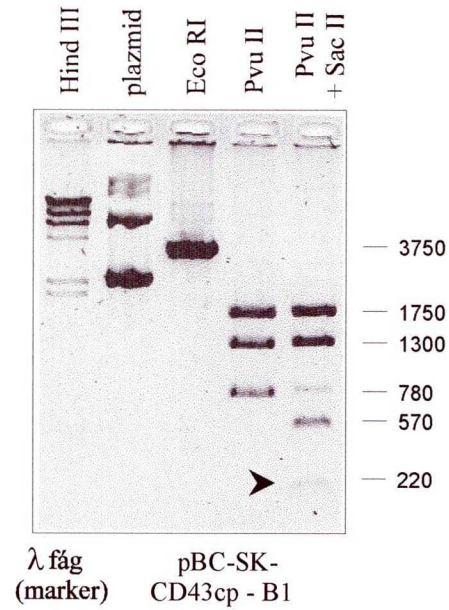


A2.



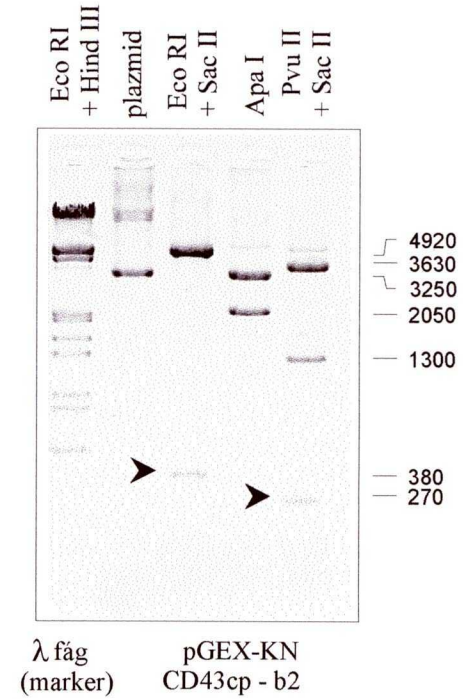
Agaróz gélelektroforézis

B2.



Agaróz gélelektroforézis

C2.



Agaróz gélelektroforézis

plazmidot tisztítottunk. Restrikciós térképezéssel (6C2. ábra) igazoltuk, hogy a felnövekedett telepek között volt olyan, amelyik a GST-CD43cp fúziós fehérjét kifejezni képes konstrukciót (pGEX-KN-CD43cp-b2) hordozta (6C2. ábra).

Ezt követően a pGEX-KN-CD43cp-b2 plazmidot *Escherichia coli* BL21 törzsébe transzformáltuk, mert a Sure törzs a fúziós fehérje termelésére alkalmatlannak bizonyult (lásd később). Az ampicillines szelekciós körülmények között felnevelt, majd IPTG-vel indukált baktérium-kultúra fehérje tartalmát SDS PAGE-sel vizsgáltuk, és kimutattuk, hogy a nem indukált baktériumokból származó lizátumhoz képest az indukált baktériumból nyert lizátum nagy mennyiségben tartalmaz egy 42 kD és egy 28 kD látszólagos molekulásúlyú fehérjét (7B. ábra, 1.-2. minta).

A fúziós fehérje túltermelésének optimalizálása

Sajnos a GST-CD43cp fúziós fehérje a túltermelés során a baktériumban proteolitikusan degradálódott. Vizsgálatainkból kiderült, hogy a fehérje lebomlásáért több egymástól független proteolitikus aktivitás is felelőssé tehető.

A GST-CD43cp fehérje proteolitikus bomlásáért részben a bakteriális sejtfalban található ompT proteáz volt felelős. Ez az enzim a baktériumok feltárásakor hasította a fúziós fehérjét. Aktivitása 0.01 M benzamidinnel gátolható volt (az eredményeket nem mutatom be). Az ompT proteáz okozta nehézségeket úgy védtük ki, hogy a fúziós fehérjét ompT hiányos BL21 baktérium-törzsben fejeztettük ki.

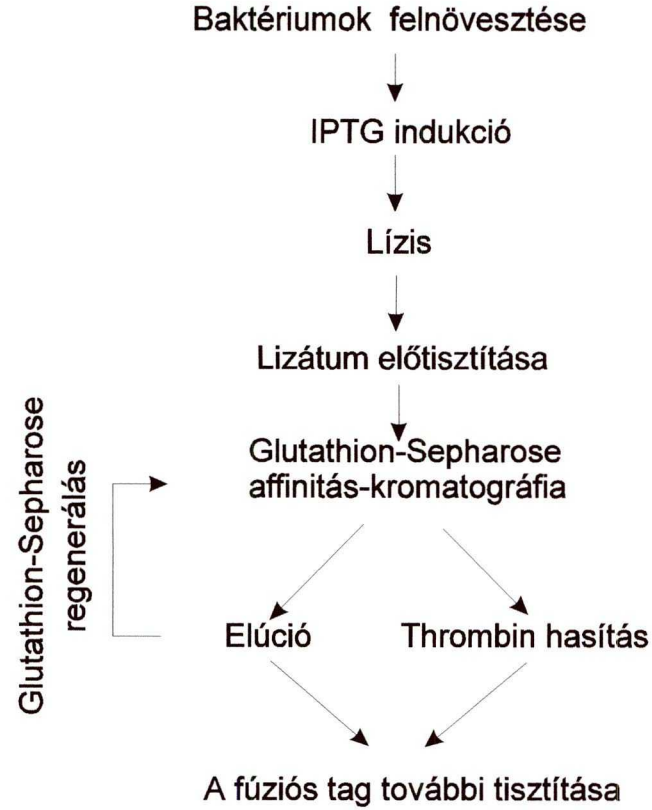
Miként azt sok más eukarióta fehérje túltermelésekor is megfigyelték, a GST-CD43cp fehérjével is együtt tisztult a 70 kD molekulásúlyú dnaK fehérje. (7B. ábra 6.-7. minta). A dnaK egy chaperon-szerű fehérje, amely a baktérium fehérjeszintézise során hibásan hajtogatódott fehérjékhez kapcsolódva aktiválja a hibás proteinek lebontását elvégző enzimrendszert, így valószínű, hogy a túltermelt fehérje proteolitikus bomlásáért részben ez a rendszer okolható (Sherman és Goldberg 1992). A fehérje degradációja ilyenkor a fehérje termelésével párhuzamosan zajlik. A fúziós fehérje bomlását egyrészt az indukciós körülmények optimalizálásával, másrészt proteázgátlók alkalmazásával kíséreltük meg csökkenteni.

Az indukciós körülmények optimalizálása nem járt sikerrel, mert sem az indukáló szer (IPTG) koncentrációjának, sem az indukció hosszának, sem pedig az indukció hőmérsékletének változtatása nem befolyásolta lényegesen a túltermelő

7. ábra

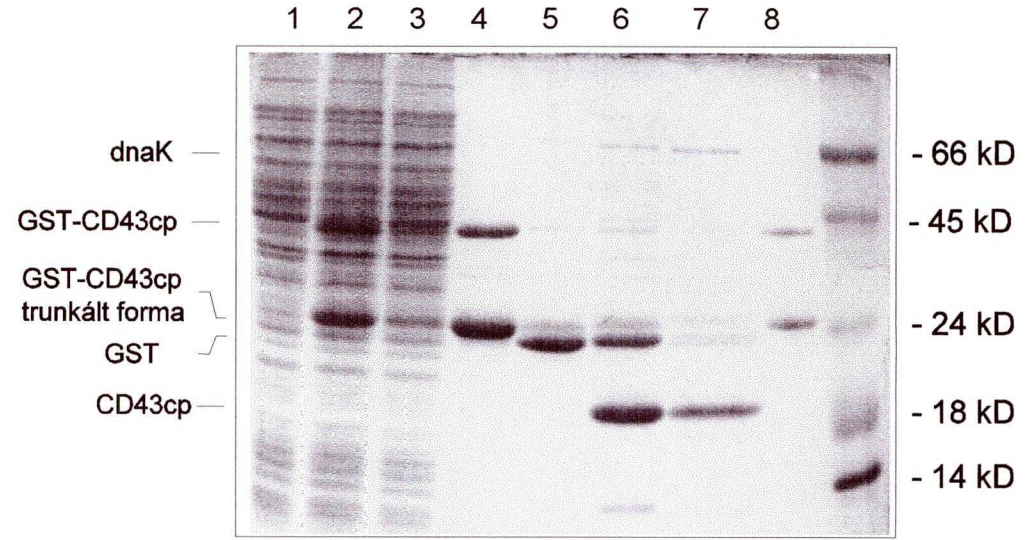
A CD43cp rekombináns fehérje tisztítása

A. A CD43cp tisztításának sematikus vázlata



B.

A CD43cp tisztítási lépéseinek ellenőrzése SDS poliakrilamid gélelektroforézis segítségével



Baktérium lizátum - indukció

Baktérium lizátum + indukció

G.S.-hoz nem kötődő fehérjék

G.S.-hoz kötődő fehérjék

G.S.-hoz kötődő fehérjék a thrombin hasítás után

G.S.-hoz nem kötődő fehérjék a thrombin hasítás után

Az előző frakció további tisztítás (Sephadex G-25) után

G.S.-hoz kötődő fehérjék a G.S. regenerálása után

GST-CD43cp degradációját (az eredményeket nem mutatom be). Megvizsgálva a különböző proteázgátlók (lásd 4.5. fejezet) hatását a fúziós fehérje degradációjára azt tapasztaltuk, hogy kizárólag a szerin-proteázgátlók voltak alkalmasak a fúziós tag proteolitikus bomlásának csökkentésére (az eredményeket nem mutatom be), így az indukció során a baktérium tápoldatához para-nitrofenil-p'-guanidino-benzoátot és fenil-metil-szulfonil-fluoridot adtunk.

Az optimalizálás ellenére a túltermelés során a fúziós fehérje 30-60 %-a proteolitikusan degradálódott, ami két kisebb mennyiségben képződő proteolitikus melléktermék képződése mellett egy 28 kD-os fő proteolitikus termék megjelenésében nyilvánult meg (7B. ábra 4. és 6. minta)

A túltermelt fehérje tisztítása

A túltermelt fehérjét a 7A. ábrán felvázolt séma szerint tisztítottuk. A túltermelt fehérjét tartalmazó előtisztított lizátum (7B. ábra 2. minta) fúziós fehérje tartalmát Glutathion-Sepharose 4B oszlopon merítettük ki (3. minta). A Glutathion-Sepharose 4B oszlopon kötött fúziós fehérjét (4. minta) a GST és a fúziós tag között hasító thrombinnal emésztettük, amelynek során a GST tag az oszlophoz kötve maradt (5. minta), míg a fúziós tag oldatba került (6. minta). A tisztítás hatékonysága nem volt kielégítő, mert az elméletileg homogén fúziós tagot tartalmazó oldat a gyakorlatban legfeljebb 50 %-os tisztaságú volt. A CD43cp-t tartalmazó oldatot ezért Glutathion Sepharose 4B gyöngyökkel kimerítettük és Sephadex G-25 gélszűrő oszlopon tisztítottuk. Így a CD43cp fúziós tagot kb. 90 %-os tisztaságúvá tudtuk tenni (7. minta), ami céljainknak már megfelelt. Az oszlophoz kötődő GST tartalmú fehérjét savas pH-jú oldattal eluáltuk (vö. 1. és 8. minták), ami lehetővé tette az affinitás-oszlop többszöri használatát.

A túltermelt fehérje szerkezetének igazolása

SDS PAGE kísérletek alapján a tisztított CD43cp fúziós tag látszólagos molekulásúlyát 20.5 kD-nak határoztuk meg (7B. ábra 7. minta), noha a fehérje aminosav-összetétel alapján számított molekulatömege csak 12,664 kD volt. Az eltérés feloldására többféle lehetőség kínálkozott.

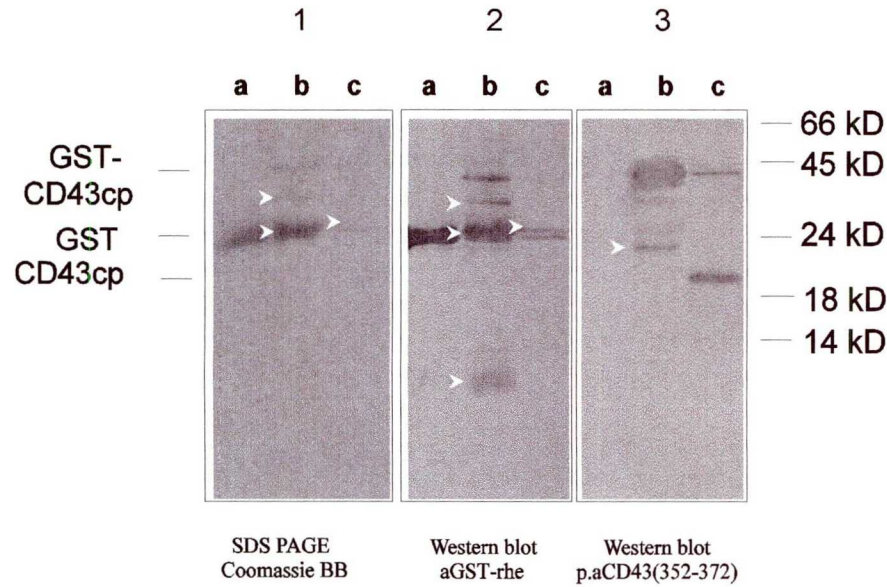
A thrombin optimális hasító helye az hAs-hAs-P-R-nsAs-nsAs. (hAs - hidrofób aminosav, nsAs nem savas aminosav). Ennek a követelménynek megfelelő aminosav-sorrend a fúziós fehérjében csak a GST és a fúziós tag között található. A thrombin azonban képes hasítani a fehérje felszínén, az enzim számára hozzáférhető helyen található A-R-G és a G-K-A szekvenciákat is (Chang 1985). A GST-CD43cp fehérjében pedig több ilyen motívum is található. Elképzelhetőnek tartottuk, hogy a thrombin a fehérjét nem a megfelelő helyen, a GST és a fúziós tag között hasítja, hanem a GST valamely felszíni A-R-G vagy G-K-A motívumánál, és ez okozza a fúziós tag várakozásnál nagyobb méretét. Ennek a lehetőségnek azonban ellentmondott, hogy egyfelől a tisztított GST-t a thrombin nem volt képes hasítani, másfelől a fúziós fehérje hasítása során az oszlophoz kötve maradó GST tag és a tiszta GST látszólagos molekulásúlya nem különbözött (az adatokat nem mutatom be). Tisztított GST-t, GST-CD43cp-t, illetve thrombinnal hasított GST-CD43cp-t tartalmazó preparátumot SDS-PAGE-sel elválasztottunk (8A. ábra, 1a.-c. minta), és western blot kísérletben megvizsgáltuk, hogy az anti-GST-rhe szérum, illetve a p.aCD43(352-372) anti-peptid szérum (lásd 5.3. fejezet) milyen fehérje-fragmenteket ismer fel (8A. ábra 2a.-c. illetve 3a.-c. minta). Amíg a GST-rhe szérum felismerte a kontrollként felvitt GST-t (2a. minta), a GST-CD43cp fúziós fehérjét (2b. minta) és a thrombin hasítás után a GST-vel megegyező mobilitású fehérjét (vö. 2a. és 2c. minta), addig a 20.5 kD-os fúziós tagot nem (2c. minta). A p.aCD43(352-372) anti-peptid szérum a várakozásoknak megfelelően felismerte a GST-CD43cp fúziós fehérjét (3b. minta) és a thrombin hasítás után keletkező 20.5 kD-os fúziós tagot, de a kontrollként felvitt és a thrombin hasítás után keletkező GST-t nem (3a. minta). A kísérletből egyértelműen kiderült, hogy a thrombin a GST és a fúziós tag között hasít. A fúziós tag hordozta az emberi CD43 fehérje 352.-372. aminosavak közötti szakaszát, ami valószínűtlenné tette azt a feltételezést is, hogy a fúziós fehérjét kódoló plazmidban történt volna valami alapvető, a transláció befejeződését befolyásoló mutáció.

Az is jól ismert tény, hogy az SDS-PAGE alapján csak ún. látszólagos molekulásúlyt kapunk, amely a valódi molekulásúlyal nem feltétlenül egyezik meg. A látszólagos és a valódi molekulásúlyok közötti különbséget leggyakrabban a fehérje poszttranszlációs módosulásai (glikoziláció, foszforiláció, stb.) okozzák, az irodalomban azonban nem találtunk egyetlen utalást sem arra, hogy a baktérium a túl-

8. ábra

A thrombin hasítás után megfelelő immunreaktivitású és molekulasúlyú termék képződik

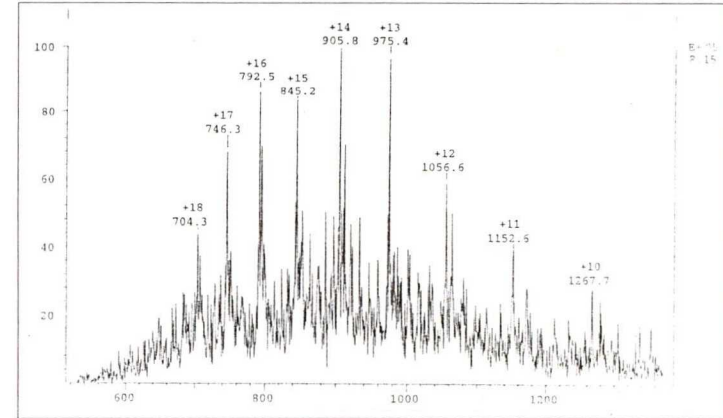
A. A CD43cp vizsgálata Western blot módszerrel



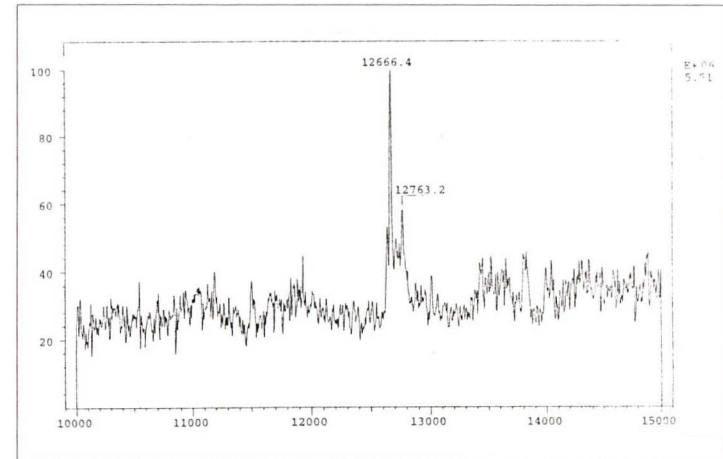
- a tisztított GST
- b tisztított GST-CD43cp
- c tisztított GST-CD43cp thrombin hasítás után
- GST-CD43cp proteolitikus fragmentjei

Mw 12666.4 ➤

B. A CD43cp tömegspektrometriás elemzése*



A tisztított CD43cp tömegspektruma



A tömegspektrumból számolt molekulasúly

*A tömegspektrometriás mérést Kele Zoltán és Szabó Pál végezte (SZOTE Orvosi Vegytani Intézet)

termelt eukarióta fehérjét úgy módosította volna, amellyel a valós és a számított molekulásúly között fennálló ilyen nagy eltérés magyarázható lett volna. Sokszor poszttranszlációs módosítást nem tartalmazó fehérjék is mutathatnak előre meg nem jósolható viselkedést, azonban ez nagyon ritkán haladja meg a tényleges molekulásúlyhoz viszonyított +/- 20%-ot az általunk alkalmazott redukáló, denaturáló SDS-PAGE rendszerben. A látszólagos és számított molekulásúly közötti eltérés magyarázatát a fúziós tag tömegspektrometriai elemzése után kaptuk meg (8B. ábra). A fúziós tag nyers tömegspektrumából (8B. ábra fent) számítás útján határoztuk meg a CD43cp valódi molekulatömegét (8B. ábra lent). A mért 12666 D mindössze két hidrogén atomnak a tömegével több, mint a számított 12664 D. Mivel a mért és a számított tömegek között jelentősebb eltérést nem kapunk, egyértelművé vált, hogy a CD43cp a transzláció után nem módosul, és az általunk észlelt anomáliáért a CD43cp fehérje SDS-PAGE körülmények között tapasztalható rendellenes viselkedése tehető felelőssé.

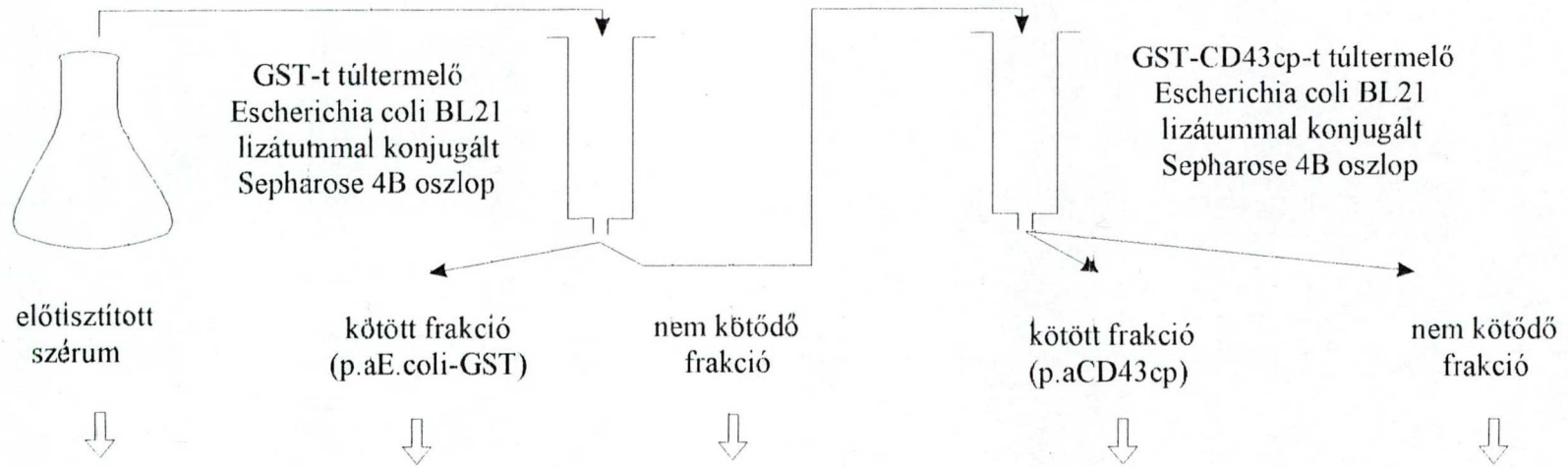
5.4.2. A p.aCD43cp szérum előállítása, affinitás-tisztítása és jellemzése

A p.aCD43cp affinitás-tisztított szérum előállítása

A CD43cp fehérje-preparátummal nyulakat immunizáltunk, majd az elvégeztetés után a vérből készült szérumot affinitás-tisztítottuk. Az affinitás-tisztítást általában az immunizálásra használt fehérjével konjugált oszlopon végzik. Esetünkben azonban az immunizálásra és az affinitás-tisztításra használt fehérje-preparátum megegyezett volna, így a fehérje-preparátum szennyező komponensei ellen képződött ellenanyagok is együtt tisztultak volna a CD43cp-t felismerő ellenanyagokkal, ezért a szérum affinitás-tisztítására egy két lépésből álló tisztítási módszert használtunk fel (9. ábra). Ennek során a szérumot először kimerítettük egy GST-t túltermelő *Escherichia coli* BL21 lizátumával konjugált Sepharose 4B oszlopon, amelynek során eltávolítottunk minden olyan ellenanyagot, amely a GST és az immunizálásra felhasznált fehérjeoldat bakteriális eredetű szennyeződése ellen képződött az immunizálás során. Ezután a szérumot egy GST-CD43cp-t túltermelő *Escherichia coli* BL21 lizátumával konjugált Sepharose 4B oszlopon tisztítottuk tovább. A bakteriális lizátum fehérjéit és a GST-t felismerő ellenanyagokat már az előző lépésben kimerítettük, így ehhez az affinitás-

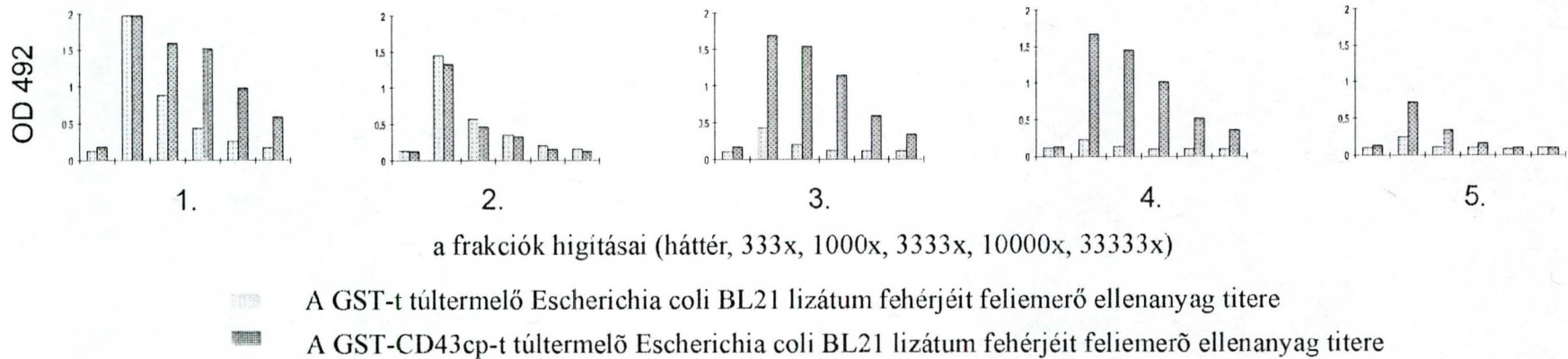
A.

Az aCD43cp szérum affinitástisztításának sematikus vázlata



B.

Az aCD43cp szérum affinitástisztítás lépéseinek ellenőrzése ELISA segítségével



mátrixhoz szelektíven a CD43cp-t kötő ellenanyag-frakció kapcsolódott, amit elúcióval összegyűjtöttünk.

A tisztítás egyes lépéseit ELISA segítségével ellenőriztük (9B. ábra). A teljes szérum erősen reagál mind a GST-t, mind a GST-CD43cp-t túltermelő baktérium-lizátummal (1. minta). A várakozásoknak megfelelően a GST-t túltermelő *Escherichia coli* BL21 lizátumával konjugált Sepharose 4B oszlopon történt kimerítés után a szérum GST-t túltermelő baktérium lizátummal szembeni titere lecsökkent, míg a GST-CD43cp-t túltermelő baktérium lizátummal a kimerített szérum továbbra is erősen reagált (3. minta). Az oszlopról eluált frakció (p.aE.coli-GST) mindkét fehérjét túltermelő baktérium lizátumot felismerte (2. minta). A GST-CD43cp-t túltermelő *Escherichia coli* BL21 lizátummal konjugált Sepharose 4B oszlopon kötődő ellenanyagok (p.aCD43cp) a szérum GST-t túltermelő baktérium lizátummal szembeni titere a háttérrel nem haladta meg, míg a GST-CD43cp-t túltermelő baktérium lizátumhoz erősen kötődött (4. minta). Az egyik oszlophoz sem kötődő, természetes ellenanyagokat tartalmazó szérumfrakció sem a GST-t, sem a GST-CD43cp-t túltermelő baktérium-lizátumot nem ismerte fel (5. minta).

A p.aCD43cp affinitás-tisztított szérum felismeri az emberi CD43 fehérjét

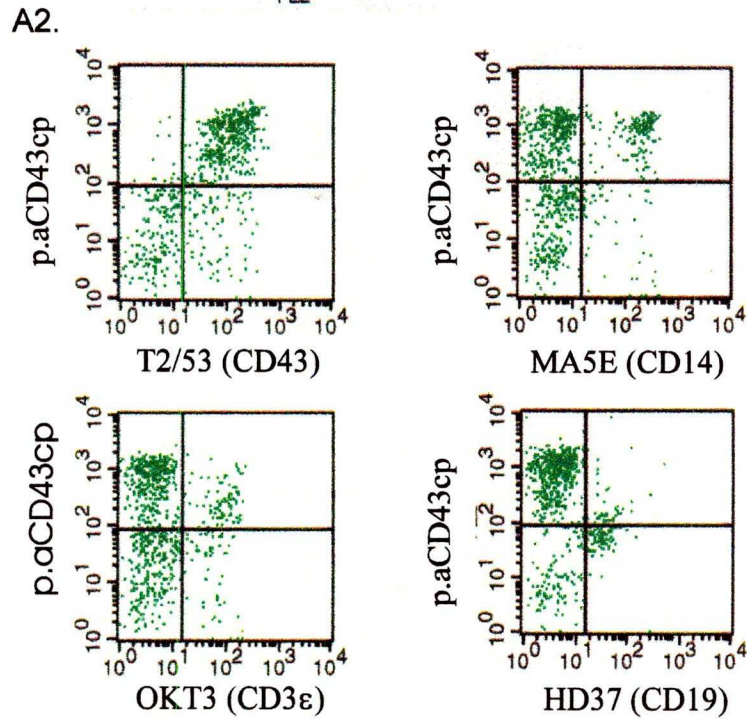
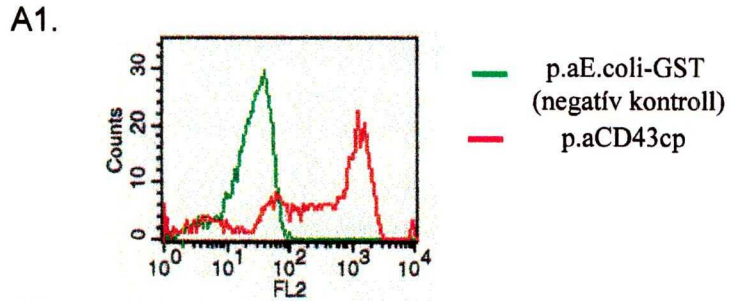
A szérumot az előző kísérletekben a bakteriálisan túltermelt CD43cp fehérje segítségével jellemeztük. A baktériumokban a fehérjék azonban nem feltétlenül ugyanolyan módon hajtogatódnak, mint az eukarióta sejtekben, ezért megvizsgáltuk, hogy a szérum felismeri-e az emberi CD43 glikoproteint.

- Áramlási citometriás módszerrel kimutattuk, hogy a p.aCD43cp szérum az emberi permeabilizált hematopoetikus sejtek egy részét specifikusan jelöli (10A1. ábra). Két különböző indirekt immunfluoreszcenciára alapuló áramlási citofluorimetriás kísérleti rendszerben is megerősítettük, hogy a szérum által felismert fehérje a CD43. Egyrészt bizonyítottuk, hogy a CD43 molekula sejten kívüli epitópjához kötődő T2/53 mEa által felismert hematopoetikus sejt vonalakat (CEM, HPB-ALL, Hut-78, Jurkat, K562, Molt4, Raji, U937) a p.aCD43cp szérum is jelölte, míg a T2/53 mEa által felismert epitópot nem kifejező sejt vonalakat (Daudi, Ramos, P3HR1) nem (az adatokat nem mutatom be). A T2/53 és a p.aCD43cp reaktivitás különböző sejt vonalokban talált ilyen egyértelmű összefüggése arra utalt, hogy a két reagens

10. ábra

A p.aCD43cp szérum felismeri a humán CD43 fehérjét különböző kísérleti rendszerekben

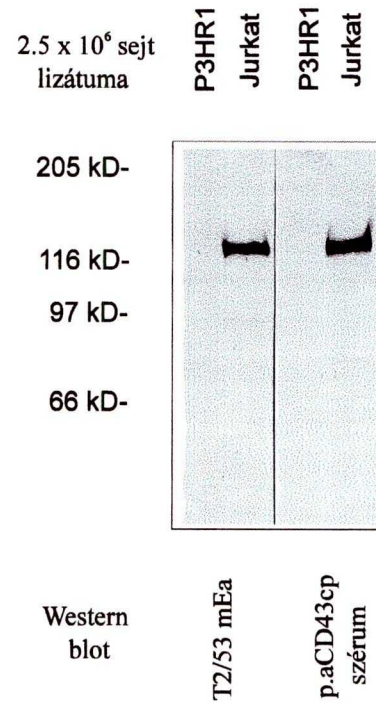
A p.aCD43cp szérum felismeri a CD43 fehérjét permeabilizált emberi PBM sejteken



A p.aCD43cp szérum felismeri a humán CD43 fehérjét

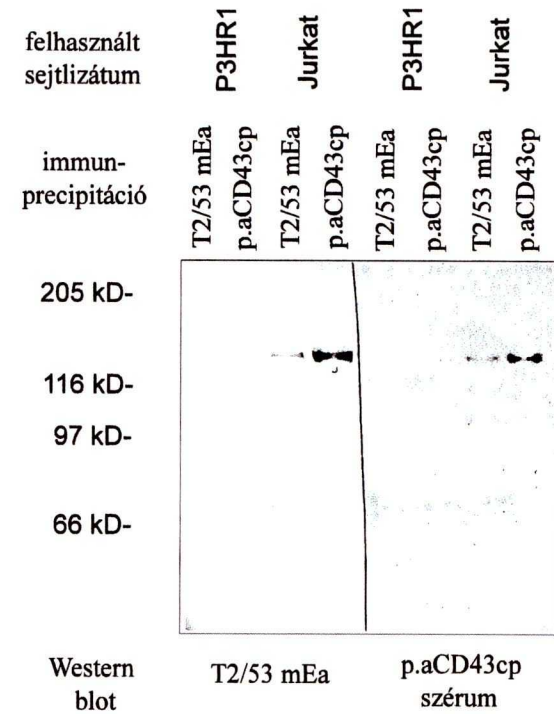
B1.

Western blotban



B2.

immunoprecipitációban

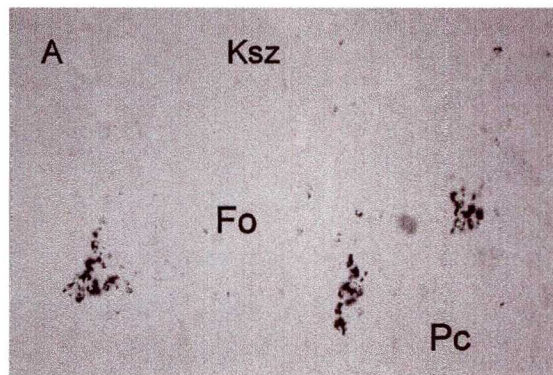


által felismert fehérje megegyezik. Másrészt kettős jelöléssel megvizsgáltuk, hogy a perifériás vér mononukleáris sejtjei közül mely sejtpopulációk jelölhetőek meg (10A2. ábra). A T2/53 mEa-gal festődő sejteket a p.aCD43cp szérum is festette, míg a T2/53 mEa-gal nem festődő sejteket nem (10A2. ábra 1. minta). A CD43cp és T2/53 reaktivitás összefüggése tehát az emberi vérsejtekre is igaz. A monocita-specifikus MA5E (CD14) mEa-gal (2. minta) és a T-limfocita-specifikus OKT3 (CD3ε) mEa-gal (3. minta) jelölődő sejtek egyúttal p.aCD43cp-vel is festődtek, míg a B limfocitákra jellemző HD37 (CD19) mEa-gal jelölődő sejtek nem (4. minta). A p.aCD43cp által felismert antigén tehát éppen azokban a sejtekben (T-limfocitákban és a monociták) volt jelen, amelyek a CD43-at kifejezik, és azokból a sejtekből hiányzott, amelyek nem.

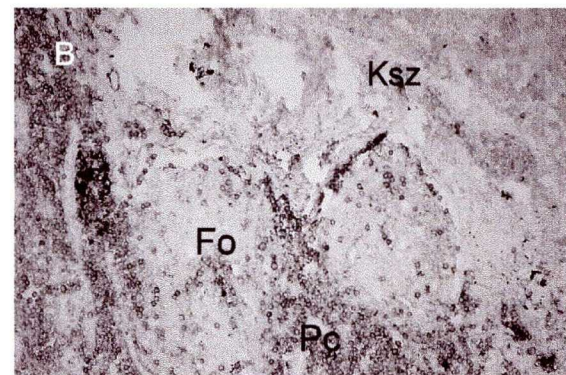
- A p.aCD43cp affinitás-tisztított szérum és a T2/53 mEa mind immunprecipitációs, mind Western blot kísérletekben hasonlóan viselkedett (10B1.-2. ábra). A CD43+ Jurkat sejtvonalból készített lizátum fehérjéi közül mindkét reagens egy 135 kD-os fehérjét ismert fel, míg a CD43- P3HR1 sejtvonalból származó lizátum fehérjéihez egyik reagens sem kötődött. Azt, hogy a két reagens által felismert fehérje azonos a CD43 fehérjével, alátámasztja az a megfigyelés, hogy a két reagens közül bármelyikkel immunprecipitált fehérjét a másik reagens Western blotting kísérletekben felismerte (10B2. ábra).
- Megvizsgáltuk, hogy a p.aCD43cp szérum felhasználható-e natív (fagyasztott) és archivált (NPF-nal rögzített és paraffinba ágyazott) szövettani metszetek immunhisztokémiai festésére. A T2/53 ellenanyaghoz hasonlóan a p.aCD43cp szérum sem adott könnyen kiértékelhető festődési mintázatot fagyasztott szövettani metszeteken (az eredményeket nem mutatom be). Az archivált anyagok esetében renaturáló előkezelés után azonban egyértelmű, reprodukálható festődést kaptunk. A festődés a várákosoknak megfelelően a sejtmembránra korlátozódott. A reakció kicsit hátteres volt, ami valószínűleg annak a következménye, hogy a CD43cp egy vagy több epitópját felismerő ellenanyagok gyenge keresztreakciót mutathatnak egy minden sejtben előforduló másik fehérjével vagy fehérjékkel. A háttér azonban az esetek többségében nem volt zavaró erősségű. Az emberi nyirokcsomóban az irreleváns szérummal (p.aE.coli-GST) specifikus jelölődést nem kaptunk (11A. ábra). Ezzel szemben a p.aCD43cp szérum felismerte a paracortex és a medulla

11. ábra

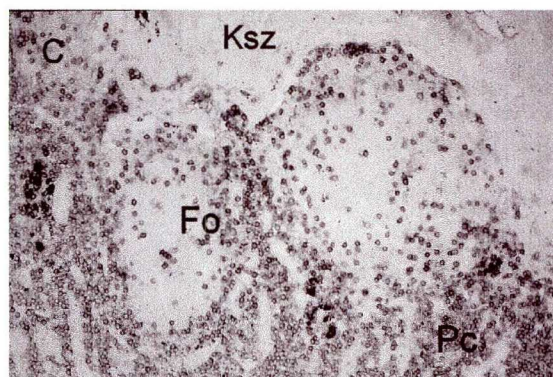
A p.aCD43cp szérum hematopoetikus sejteket ismer fel a neutrális pufferelt formalinnal rögzített paraffinba ágyazott emberi nyirokszövetekben



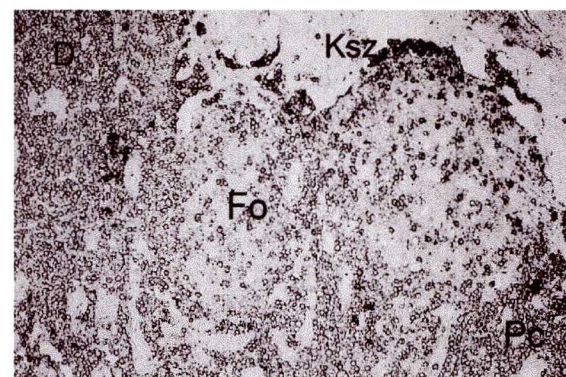
p.aE.coli-GST



T2/53 (CD43) mAb



p.aCD3ε(177-190)



p.aCD43cp

Fo: folliculus, Pc: paracortex, Ksz: kötőszövet

sorozatmetszetek
emberi nyirokcsomóból

sejtjeinek túlnyomó többségét, és a folliculusokban található limfociták kisebb hányadát (11D. ábra). A T-limfocitákat felismerő p.aCD3ε(177-190) szérummal kapott festődési mintázattal összehasonlítva egyértelmű, hogy a festődött fehérvérsejtek zöme T-limfocita (11C. ábra). Érdekes viszont, hogy az ugyancsak CD43 fehérjét felismerő T2/53 mEa-gal végzett immunfestés, hasonló, de jellegzetes eltéréseket mutató festődési mintázatot adott: a p.aCD43cp szérum ugyanis a folliculusokban több sejtet ismert fel, mint a T2/53 mEa (11B. ábra). Ennek az ellentmondásnak a kísérletes feloldása eddig nem sikerült, de magyarázatként elképzelhető, hogy bizonyos p.aCD43cp+ sejtek olyan CD43 glikoformát (sajátosan glikozilált fehérjét) fejeznek ki, amelyet a T2/53 mEa nem ismer fel. Többféle emberi immunszerv (nyirokcsomó, lép) immunhisztokémiai vizsgálata alapján bebizonyosodott, hogy a p.aCD43cp szérum által felismert epitópok jelen vannak a T-limfocitákon, a monocitákon és a granulocitákon, valamint a makrofágok és talán a B-limfociták egy kisebb csoportján. A szérum nem-hematopoetikus eredetű sejteket egyetlen esetben sem jelölt.

A három különböző kísérleti rendszerben tehát azt találtuk, hogy a p.aCD43cp szérum a humán CD43 fehérjét natív (indirekt immunfluoreszcencia, immunprecipitáció, immunhisztokémia) és denaturált (Western blot) körülmények között egyaránt felismeri.

5.4.3. A p.aCD43cp által felismert epitópok jelenléte a különböző állatfajokban

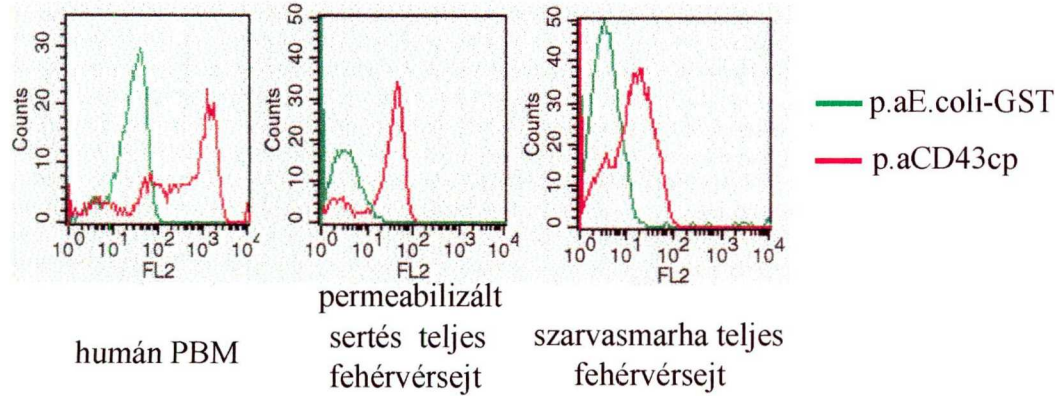
A CD43 fehérjét kísérleteink kezdetének időpontjában csak emberben, egérben és patkányban írták le ellenanyagok segítségével. A három fajtól származó aminosav-sorrendek összehasonlításakor kiderült, hogy a CD43 fehérje sejten kívüli része már ezen fejlődéstanilag közel álló fajokban is csak kis mértékben állandósult. Ennek ismeretében nem meglepő, hogy a sejten kívüli CD43 epitópokat felismerő ellenanyagok – mint pl. az emberi CD43 fehérje sejten kívüli epitópját felismerő T2/53 mEa – általában még közeli rokon fajok CD43 fehérjéit sem ismerik fel. A fehérje citoplazmatikus szakasza legalábbis e három evolúciós értelemben egymáshoz közeli rokon fajban viszont nagy fokú állandósultságot mutat (2. ábra).

Megvizsgáltuk tehát, hogy az emberi CD43 fehérje citoplazmatikus régióját felismerő p.aCD43cp szérum az állatfajok milyen körében alkalmas a CD43 fehérje kimutatására.

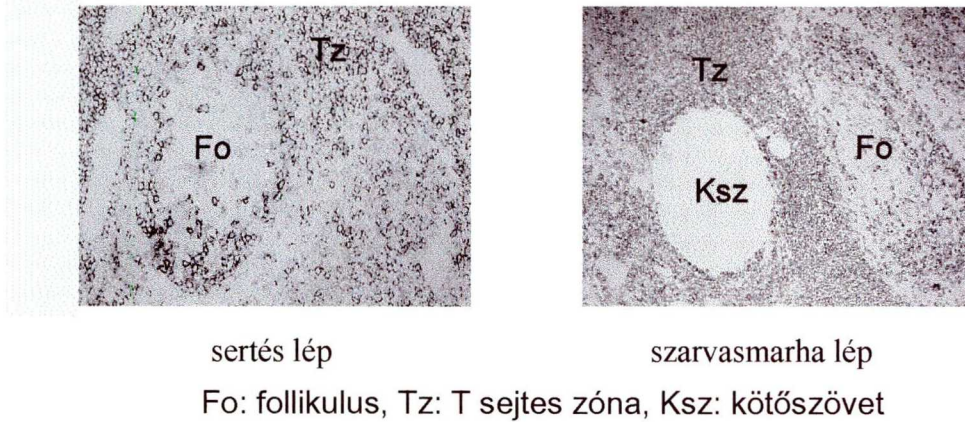
- Áramlási citometriás kísérletekben indirekt immunfluoreszcenciás jelölés mellett kimutattuk, hogy a p.aCD43cp szérum az irreleváns negatív kontrollhoz (p.aE.coli-GST) viszonyítva a permeabilizált szarvasmarha és sertés fehérvérsejtek zömét jelölte (12A. ábra). A mieloid sejteket több emlősfajban felismerni képes DH16 mEa-gal (lásd 5.1.3. fejezet) és a p.aCD43cp szérummal kettősen jelöltünk szarvasmarha- és sertés-fehérvérsejteket. A p.aCD43cp szérum által felismert epitóp jelen volt valamennyi DH16+ fehérvérsejtben és a DH16- fehérvérsejtek egy részében (az eredményeket nem mutatom be). A DH16- sejtpopuláció limfocitákat és a vörös vértesteket tartalmazott, a permeabilizált vörösvértetek viszont a p.aCD43cp szérummal nem voltak jelölhetők (az eredményeket nem mutatom be). A p.aCD43cp szérum – akárcsak az emberben – a monocitákat, granulocitákat és a limfociták egy részét jelölte a vizsgált két állatfajban.
- Western blot kísérletekben a reagens csak az emberből és az egerből származó sejtlizátumokban ismert fel fehérjét, míg a sertés, a szarvasmarha és a tyúk fehérvérsejt lizátumában nem (12B. ábra). A vizsgált két fajban a kimutatott fehérje az észlelt molekulásúly alapján feltehetően a CD43.
- A különböző rendszertani csoportokba tartozó állatokból származó NPF-ban rögzített paraffinba ágyazott szövettani metszeteket megfestettük p.aCD43cp szérummal, illetve negatív kontrollként egy irreleváns antiszérummal (pE.coli-GST). A kísérletekben az alábbi állatfajokból származó szöveti mintákat használtam fel:

Halak		ponty
Kétéltűek		ásóbéka (<i>Pelobates fuscus</i>)
Madarak	Partimadár alkatúak	nagy póling (<i>Numenius arquata</i>)
	Tyúkkalkatúak	házi tyúk, házi pulyka
	Lúdalkatúak	házi kacsa
Emlősök	Ragadozók	kutya, macska, nyérc
	Párosujjú patások	szarvasmarha, juh, kecske, sertés
	Páratlanujjú patások	ló
	Rágcsálók	házi egér (<i>Balb/c</i>), házi patkány

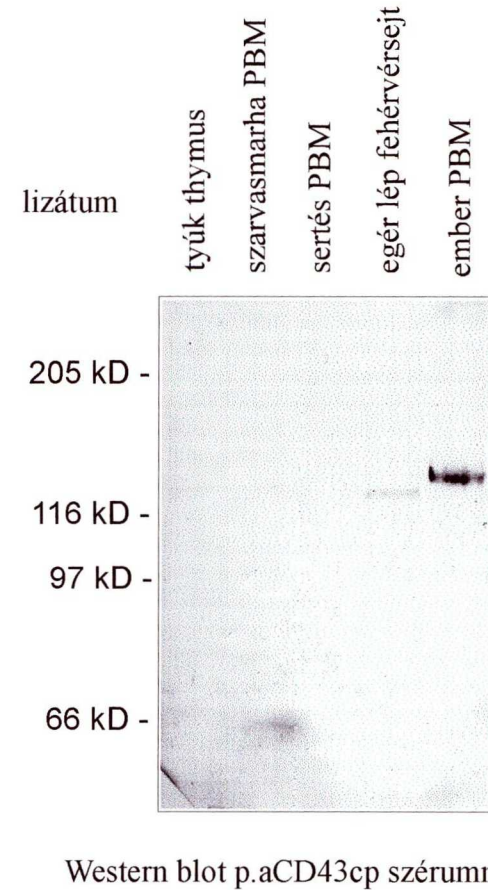
A. A p.aCD43cp szérum felismeri a CD43 fehérjét több állatfaj permeabilizált fehérvérsejtjeiben



C. A p.aCD43cp szérum hematopoetikus sejteket ismer fel több állatfaj NPF-ban rögzített paraffinba ágyazott nyirokszöveteiben



B. A p.aCD43cp szérum a CD43 fehérjét csak az emberhez evolúciós értelemben közeli taxonokban ismeri fel western blot kísérletekben



A p.aCD43cp szérummal egyetlen hal-, kétéltű- és madárfaj egyetlen szervében sem kaptunk specifikus jelölődést (az eredményeket nem mutatom be). A ragadozók rendjébe tartozó fajok kivételével a vizsgált emlősfajokban azonban valamennyi esetben határozott festődést kaptunk. Tapasztalataink szerint, bár a reagens epitóp reaktiválási körülmények alkalmazása nélkül is adott gyenge specifikus jelet, renaturációs előkezeléssel kaptunk erős jól értékelhető jelölődést, amely a sejtek zömében a sejtmembránra korlátozódott. Az emlősfajok immunszerveinek immunhisztokémiai jelölése után észlelt festődési mintázatok vizsgálata során kiderült, hogy a p.aCD43cp szérum kizárólag hematopoetikus sejteket ismer fel. A p.aCD43cp által felismert epitópot elsősorban a nyirokszervekben található limfoid sejtek hordozták: A T-sejtes területeken a limfociták zöme, míg a B-sejtes zónákban csak néhány limfocita jelölődött (12C. ábra). A follikulusokban észlelt elszórt festődő sejtek egyrészt a régióban előforduló T-sejtek lehettek, de nem kizárható, hogy a CD3ε- limfociták (B-sejtek) is kifejezik a p.aCD43cp által felismert epitópot. A vizsgált immunszervekben a kisebb számban jelen lévő mieloid sejtek is festődtek. A p.aCD43cp szérum tehát hasonló struktúrákat ismert fel az ember és a vizsgált emlősfajok immunszerveiben.

A három különböző kísérleti rendszerben tehát egyaránt azt találtuk, hogy az emberi CD43 citoplazmatikus szakaszát felismerő p.aCD43cp szérum specifikus keresztreakciót mutat az általunk vizsgált emlős fajok zömében. A keresztreakció specificitását jelzi, hogy mind az emberben, mind a vizsgált emlősfajokban a szérum által felismert antigén egy olyan membránfehérje, amelynek expressziója a hematopoetikus sejtekre, azoknak is egy nagyon jellemző csoportjára, a T-limfocitákra, a B-limfociták egy részére és a mieloid sejtek zömére korlátozódik. Feltételezhető ezért, hogy a p.aCD43cp szérum az általunk vizsgált emlősfajok zömében a humán CD43-mal homológ állati CD43 fehérjét ismeri fel.

A jelölődés erőssége (az indirekt immunfluoreszcenciás kísérletekben mért átlagos fluoreszcencia intenzitás) az emberi fehérvérsejtekben mért értékekhez képest a sertés és a szarvasmarha fehérvérsejtjeiben sokkal alacsonyabbnak bizonyult (12A. ábra). Ezt magyarázhatja az, hogy az állati sejtekben kisebb mennyiségű CD43 antigén fejeződik ki, de valószínűbb az, hogy az állati sejtekben kisebb mennyiségű CD43 antigén fejeződik ki, de valószínűbb az, hogy az embertől evolúciósan egyre távolabbi fajokban a konzervált epitópok aránya csökken, ami a jelölődés erősségének csökkenéséhez

vezethet. Hasonlóan magyarázható az a tény is, hogy Western blot körülmények között a p.aCD43cp szérum csak az emberhez fejlődéstani értelemben legközelebbi rokon faj (egér) fehérvérsejt lizátumában ismerte fel a CD43-nak megfelelő mobilitású fehérjét, míg a sertésben és a szarvasmarhában nem. Elképzelhető ugyanis, hogy az epitóp, amely lehetővé teszi ezzel a módszerrel a CD43 fehérje denaturált formájának a felismerését emberben és egérben, a sertésben és a szarvasmarhában az evolúció során olyan mértékben megváltozott, hogy a p.aCD43cp szérumot már nem képes kötni.

A p.aCD43cp szérum tehát lehetővé teszi a CD43 fehérje kimutatását olyan fajokban (sertés, szarvasmarha, ló stb.), amelyekben eddig nem sikerült sejtfelszíni epitóppal reagáló CD43 mEa-ot előállítani, ezáltal kiinduló pontot biztosíthat a CD43 fehérje legkülönbözőbb állatfajokban történő biokémiai, molekuláris biológiai és funkcionális szintű jellemzéséhez.

5.4.4. A p.aCD43cp szérum alkalmazási lehetőségei az állatorvosi diagnosztikában

Megvizsgáltuk, hogy a p.aCD43cp ellenanyag mennyire alkalmas a CD43+ sejtek patológiás eloszlásának jellemzésére különböző állati kórképekben. Kísérleteinkhez ugyan azokat a Magyar Országos Állategészségügyi Intézet archívumából kiválogatott mintákat használtuk, amelyeket a korábbi vizsgálataink során p.aCD3ε(177-190) szérummal is megfestettünk, így a CD43+ sejtek eloszlását a CD3ε+ sejtek eloszlásával össze tudtuk hasonlítani.

A várakozásoknak megfelelően az emlős fajok többségében a CD43+ sejtek kimutatása eredményes volt, noha a kóresetekből származó minták kora az immunhisztokémiai festés időpontjában elérhette a tíz évet, és a patológiás szövetmintákat nem a humán gyakorlatban szabványosított, az immunreaktivitást optimális módon megőrző körülmények között rögzítették és ágyazták be.

A *vírusok* elleni immunválaszban a CD43+ sejtek közül csak a T-limfociták szerepe nyilvánvaló, így a várakozásoknak megfelelően ezekben a kórképekben a CD43+ sejtek zöme egyúttal CD3ε+ fenotípust mutatott. Az invazív prokarióta kórokozók által kiváltott esetekben származó patológiás szöveteket a CD43+ granulociták (actinobacillosis) vagy a CD43+ monociták (salmonellosis) túlsúlya jellemezte. Természetesen azokban a kórképekben, ahol a celluláris immunválasz szerepe is jelentős, nagy mennyiségű CD3ε+CD43+ T-limfocita is jelen volt a szövetek-

p.aCD3ε(177-190)

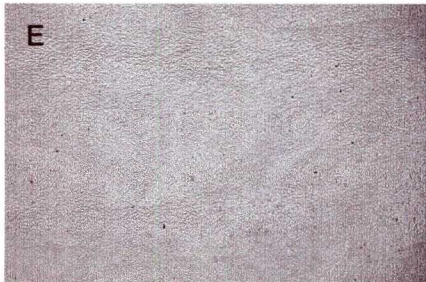
p.aCD43cp



juh agyszövet - listeriosis



ló tüdőszövet - mycoplasmosis



szarvasmarha szívszövet - limfoid leukózis

A.-B. A *Listeria monocytogenes* fertőzés következtében agyvelőgyulladásban elhullott juh agyvelőjét nagy mennyiségű fekete nyilakkal jelölt mononukleáris sejt szűrte be, melyek elsősorban a vérerek körül gyűltek össze (perivasculitis). A mononukleáris sejtek egy része CD3ε+CD43+ T limfocitának (A.+B.), míg másik része CD3ε-CD43+ monocitának bizonyult (B.).

C.-D. Azonosítatlan *Mycoplasma* faj okozta tüdőgyulladásban elhullott ló tüdejéből készült metszeten látható, hogy az alveólusok (Alv) fala helyenként megvastagodott, és bennük intersticiálisan, illetve gócban nagyobb mennyiségű fekete nyilakkal jelölt mononukleáris sejt halmozódott fel. A jelölődött sejtek részben CD3ε+CD43+ T limfociták (C.+D.), részben CD3ε-CD43+ monociták (D.).

E.-F. Bizonyítottan Retrovirus eredetű limfómában (limfoid leukózis) elhullott szarvasmarha szívizomszövetét limfoid morfológiájú sejtekből álló tumor (Tu) szűrte be (fekete nyíl). A tumor limfoid sejtjei CD3ε- (E.) CD43+ (F) fenotípust mutattak.

ben (listeriosis (13. A.-B. ábra), paratuberculosis, mycoplasmosis (13C.-D. ábra.)). Az általunk vizsgált *mycosisokban* egyértelműen a CD43+ granulociták és monociták túlsúlya volt megfigyelhető, CD3ε+ T-sejteket csak elszórva láttunk. A protozoák és paraziták okozta fertőzéseknél a fertőzött szövetekben attól függően találtunk különböző típusú CD43+ sejteket, hogy az adott parazitafaj ellen kialakuló immunválaszban milyen típusú sejteknek van meghatározó szerepük. A gyulladással kiváltó, legtöbbször fertőző betegségek diagnózisában a fertőző ágens kimutatásán alapuló diagnosztikai módszereknek van alapvető fontossága, a gyulladással területeket beszűrő sejtek jellemzése a rutin eljárások során csak másodlagos jelentőségű.

Ahogy a p.aCD3ε(177-190) szérumnak, így a p.aCD43cp reagensnek is a limfoproliferatív és a limfoid daganatok eredetének meghatározásában lehet fontosabb szerepe a jövőben. Mind a szarvasmarhából származó, Retrovirus által kiváltott, mind a sertésből származó ismeretlen eredetű rosszindulatú limfómát (limfoid leukózis) alkotó CD3ε- sejtek (13E.-F. ábra), erősen festődtek a p.aCD43cp szérummal. Látszólag ellentmondásnak tűnhet, hogy ez a két B-sejt eredetű limfóma CD3ε-CD43+ fenotípust mutat, hiszen az egészséges szövetekben található B-limfociták zöme nem fejezték ki CD43 fehérjét. Az emberi és eger B-sejtérés korai szakaszában a B-sejtek CD43+-ak, és csak a B-sejtérés későbbi szakaszában veszítik el CD43 expressziójukat. A humán B-sejt eredetű limfómák jelentős részében ezért a CD43 kifejeződik. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy mind a Retrovirus okozta szarvasmarha limfoid leukózis, mind az ismeretlen eredetű sertés limfoid leukózis korai B-sejtes eredetű neoplázia. A p.aCD43cp reagenssel tehát lehetővé válik a limfoid daganatok pontosabb fenotipizálása.

A CD43 molekulát, bár nem fejeződik ki minden hematopoetikus sejten, jó hatékonysággal lehetne különböző daganatok hematopoetikus eredetének bizonyítására használni. Ilyen értelemben a p.aCD43cp szérum a humán patológiában alkalmazott CD45 ellenanyagok diagnosztikai felhasználási körét töltene be addig, amíg a hematopoetikus eredet kimutatására az állatok széles körében alkalmazható jobb reagens nem áll rendelkezésre.

6. Következtetések

Munkámban az állatorvosi rutindiagnosztikában felhasználható, fehérvérsejtek kimutatására alkalmas olyan immundiagnosztikumok kifejlesztését tűztem ki célul, amelyek egyértelmű, megbízható és reprodukálható eredményeket adnak a különböző állatfajokból származó rögzített szövettani mintákon. A célkitűzésben megfogalmazott kettős követelményrendszernek számos különböző megközelítéssel előállított immunreagens eleget tett. Az általunk, illetve más laboratóriumokban kifejlesztett immunreagensekkel szerzett tapasztalatok tanulságul szolgálhatnak további, hasonló célra felhasználható immundiagnosztikumok kifejlesztéséhez.

6.1. Fehérjekeverékkel és tisztított antigénnel végzett immunizálás előnyei és hátrányai

Mivel az állatfajok zömében az immunsejtekre jellemző fehérjéről szerzett ismereteink meglehetősen hiányosak, a fehérvérsejt-fehérjék tisztítása általában nem oldható meg. Az immunizálásra felhasználhatunk fehérjekeverékeket, mint például fehérvérsejt-szuszpenziókat, a kívánt ellenanyag-specifitást kiválasztása ilyenkor azonban különösen átgondolt megközelítést tesz szükségessé. A fehérjekeverék egyes összetevői ellen ugyanis csak gyenge és előre nem kiszámítható erősségű immunválasz alakul ki, ezért az immunizált állatokban csak kis valószínűséggel képződik a kívánt specificitású ellenanyagot termelő B-sejtklón. A *fehérjekeverékkel végzett immunizálás* eredményeképpen létrejövő szérum kívánt specificitású ellenanyag-frakciójának affinitás-tisztítása csak ritkán valósítható meg. Az ellenanyagot termelő B-limfociták mielóma sejtekkel történő fúziójával olyan hibridóma sejtklónok alakulhatnak ki, amelyek a kívánt specificitású ellenanyag termelésre képesek. Az állatorvosi célokra felhasználható ellenanyagot termelő klónok kiválasztása ilyenkor is egy olyan tesztelő rendszer kidolgozását igényli, amely lehetőséget teremt a kívánt és a nem kívánt specificitású ellenanyagot termelő klónok megkülönböztetésére. Ez sok esetben – például intracelluláris fehérvérsejt-epitópokat felismerő monoklonális ellenanyagok előállításánál – technikai szempontból komoly nehézséget jelent, a fehérvérsejtek felszíni antigénjeit felismerő ellenanyagok rutinszerű előállítása azonban megoldott.

Az elmúlt húsz évben az ember és több állatfaj fehérvérsejt-antigénjeinek sejtfelszíni epitópjait felismerő monoklonális ellenanyagokat hoztak létre az előbb ismertetett megközelítéssel. A megfelelő specificitású monoklonális ellenanyagok

segítségével a felismert antigéneket jellemezték, ami nagy mértékben hozzájárult az immunrendszer működésének jobb megértéséhez az emberben és a különböző állatfajokban. Az emberi fehérvérsejt-felszíni antigéneket kötő monoklonális ellenanyagok által felismert epitópok zöme azonban a rögzítés hatására visszafordíthatatlanul módosul. Mivel az állatorvosi rutindiagnosztikában alkalmazható immunreagensektől azt is elvárjuk, hogy a fajok széles körében alkalmazhatók legyenek, még tovább csökken annak a valószínűsége, hogy a fehérjekeverékekkel végzett immunizálás eredményeképpen megfelelő immundiagnosztikumot nyerjünk. A háromszázöt szarvasmarha sejtfelszíni epitópot felismerő monoklonális ellenanyag közül mindössze kettő felelt meg az állatorvosi diagnosztikumoktól elvárható kettős követelményrendszernek.

A fehérjekeverékekkel végzett immunizálás legnagyobb hátránya tehát az irányíthatatlanság. Nem tudjuk szabályozni azt, hogy az immunválasz a fajok széles körében állandósult és a rögzítés során visszafordíthatatlan változást nem szenvedő epitópok ellen irányuljon. A fehérjekeverékekkel végzett immunizálásra alapuló immunreagensok állatorvosi rutindiagnosztikai célokra történő előállítására ezért csak ritkán célravezető. A már más célból létrehozott sejtfelszíni fehérvérsejt-epitópokat felismerő ellenanyagok rögzített szövettani metszeteken történő tesztelésével azonban bizonyos állatfajban, vagy az állatfajok szorosabb rokonságot mutató csoportjában jól alkalmazható reagenseket nyerhetünk.

A tisztított antigénnel végzett immunizálással létrehozott reagensek előnye, hogy az antigéneket úgy választhatjuk meg, hogy a reagens az állatorvosi rutindiagnosztikumokkal szemben támasztott követelményeknek eleget tegyen.

Az antigén tisztítása a sejtekben nagy mennyiségben előforduló fehérjék esetében a hagyományos biokémiai elválasztási módszerekkel is megvalósítható. Több citoskeletális fehérje (aktin, dezmin, vimentin) ellen termelt ellenanyagról derült ki, hogy felhasználhatók rögzített szövettani minták vizsgálatára számos madár- és emlősfajban. A kisebb mennyiségben jelenlévő, ezért a hagyományos biokémiai módszerekkel nehezen tisztítható fehérvérsejt-felszíni fehérjék esetében ez az út nem járható.

Az elmúlt évtizedben robbanásszerűen megnőtt a rendelkezésre álló aminosavszekvenciák – illetve az ezekkel egyenértékű cDNS-szekvenciák – száma és hozzáférhetősége. A fehérjék aminosav-sorrendjének ismeretében *peptideket*

szintetizálhatunk (pl. CD3 ϵ (177-190) vagy CD43(352-372)) vagy molekuláris biológiai eszközökkel olyan *rekombináns fehérjéket* termelhetünk (pl. CD43cp), amelyek lehetővé teszik a rekombináns fehérje hatékony tisztítását (pl. GST fúziós fehérje). A peptideket és rekombináns fehérjéket antigénként felhasználva megfelelő immunreagenseket hozhatunk létre.

6.2. A peptidekkel és a rekombináns fehérjékkel végzett immunizálás előnyei és hátrányai

A peptidek és a rekombináns fehérjék előállítása

A peptidszintézis ma már a rutin módszerek közé tartozik. Tetszőleges aminosav-sorrendű peptidek a kereskedelmi forgalomban is könnyen beszerezhetők, a peptidek előállítása így nem köt le kutatói erőforrásokat. A rekombináns fehérjék előállítása ugyanakkor a molekuláris biológiai és fehérjebiokémiai módszerekben szerzett jártasságot, illetve ezeket a módszereket lehetővé tevő laboratóriumi háttérrel követel meg.

Az immunogén fehérjeszakaszok kijelölése

Mivel az immunizáláskor kialakuló immunválasz erőssége szabja meg a megfelelő ellenanyagot termelő B-sejtklónok gyakoriságát és a szérumban ellenanyag-titerét, mind a monoklonális ellenanyagok, mind az affinitás-tisztított szérumok előállításánál kiemelkedően fontos, hogy az immunizálásra felhasznált antigén immunogén legyen. Noha létezik néhány algoritmus, amellyel egy adott fehérjeszakasz immunogenitása jósolható, az immunogenitás aminosav-sorrend alapján történő előrejelzése ma még nagyon bizonytalan. Egy antigén immunogenitása ugyanis nem csak az immunizálásra felhasznált fehérjétől vagy peptidtől függ, hanem az immunizálás módjától és az immunizált állat faj- és egyedszintű tulajdonságaitól is. Kísérleteinkben mi is számtalanszor tapasztaltuk, hogy a párhuzamosan immunizált állatok sokszor egymástól teljesen eltérő erősségű immunválaszt adtak.

A nem kielégítő immunogenitás elsősorban a peptidekkel történő immunizáláskor jelenthet több okból is nehézséget.

- A peptidek önmagukban általában nem váltanak ki erős immunválaszt, ezért a peptideket hordozókhoz kapcsolják. Az immunválasz egy része ilyenkor természetesen a leggyakrabban fehérje-természetű hordozók ellen irányul.
- A peptidhez kötődő ellenanyagok jelentős része a peptidek amino- és karboxiterminálisait ismeri fel. Ezek az ellenanyagok a fehérjéhez csak abban az esetben kötődnek, ha a fehérje aminosav-sorrendje alapján szintetizált peptid valamelyik terminális aminosava egyúttal a fehérje terminális aminosava (Jones és tsi. 1994).
- A peptidek nem feltétlenül olyan szerkezetet vesznek fel, mint a peptid aminosav-sorrendjének megfelelő fehérjeszakasz, így a peptidekhez kötődő ellenanyagok a fehérjét nem feltétlenül ismerik fel. Ráadásul egy fehérjével szemben képződött ellenanyagok tekintélyes része olyan, a fehérjék bonyolult harmadlagos szerkezetétől függő konformációs epitópokhoz kötődik, amelyeket az anti-peptid szérumok csak kivételes esetben ismernek fel.

Az általunk szintetizált CD43(352-372) peptid ellen gyenge immunválasz jött létre, így a p.aCD43(352-372) szérum a kitűzött céloknak nem felelt meg. A magas prolintartalma miatt immunogénnek jósolt CD3ε(177-190) peptid viszont erős immunválaszt indukált (Mason és tsi. 1989).

A rekombináns fehérjék az előbb említett kedvezőtlen tulajdonságokkal nem rendelkeznek. Egy teljes fehérje vagy fehérjedomén ugyanis már megfelelő méretű ahhoz, hogy hordozó fehérje nélkül lehessen immunizálni. A rekombináns fehérvérsajt-fehérje szerkezete is nagy valószínűséggel megegyezik a fehérvérsajtben termelődő formáéval, így a rekombináns fehérjét felismerő ellenanyagok a fehérvérsajtben kifejeződő formához is kötődhetnek. Amennyiben egy adott fehérjét felismerő ellenanyagot akarunk készíteni, a teljes fehérje vagy fehérjedomén immunizálásra történő felhasználása a peptidek hasonló célú alkalmazásához viszonyítva abból a szempontból is kedvezőbb, hogy amíg a peptidek esetén a kísérletezőnek kell az adott fehérjén vagy fehérjedoménen belüli immunogén területeket kiválasztani, addig a fehérjék vagy fehérjedomének esetében ezt maga az immunizált állat "teszi meg".

Az állandósult fehérjeszakaszok kijelölése

A legtöbb immunológiai ismeret az ember és az immunológiai kutatásokban modellállatként alkalmazott egér fehérjéiről áll rendelkezésre, míg az állatorvosi szempontból igazán jelentős fajok esetében ilyen adatok csak elvétve találhatók. Ez természetesen nem könnyíti meg az állatfajok fehérvérsejt-fehérjéit felismerő immunreagensek kifejlesztését. Az állandósult fehérjeszakaszok megkeresése azonban kijelölheti az immunizálásra felhasználható antigént, hiszen az állandósult szerkezetű epitópok ellen képződő ellenanyagok a fajok széles körében felhasználható reagenseket eredményeznek. A fehérjékben található állandósult szerkezetű szakaszok azonosítására két különböző megközelítés is alkalmas lehet.

Amennyiben egy fehérvérsejtekre jellemző fehérje aminosav-sorrendje több fajban ismert, a szekvenciák összehasonlításával az állandósult szakaszok kijelölhetők. Kísérleteink során ezzel a módszerrel azonosítottuk a CD3 ϵ és CD43 fehérjék állandósult szakaszait. Hátránya ennek a megközelítésnek, hogy a jelenlegi algoritmusok az összehasonlítást csak az aminosav-sorrend szintjén tudják elvégezni, a fehérje térbeli szerkezetében található állandósult szerkezetekről nem adnak felvilágosítást.

Gyakran csak egy fajból származó, általában az emberi vagy az egérfehérje aminosavsorrendje áll rendelkezésre. Ha az ilyen fehérjék feladatát ismerik, és a vizsgált funkció (pl. adhézió, jeltovábbítás stb.) a fajok szélesebb körében állandósult, az ezeket a feladatokat betöltő fehérjeszakaszok térképezésével az immunizálásra alkalmas olyan antigéneket azonosíthatunk, amelyek ellen létrehozott immunreagensek a hasonló immunfunkciókkal rendelkező állatfajok homológ epitópjait is felismerik.

A rögzítés és beágyazás körülményei során visszafordíthatatlan változásokat nem szenvedő fehérjeszakaszok kijelölése

Sajnos a rögzítés és a beágyazás, illetve az epitóp visszanyerési módszerek során létrejövő változások ma még alig ismertek. Nem meglepő ezért, hogy a szekvencia-adatok alapján ma még nem megjósolható, hogy melyek azok az epitópok, amelyeket felismerő ellenanyagok az állatorvosi diagnosztikum ezen szempontjának megfelelnek. A rögzítési, beágyazási és epitóp visszanyerési technikák további fejlődése a jövőben várhatóan meg fogja növelni a rögzített anyag használható reagensek arányát.

Peptiddel vagy rekombináns fehérjével immunizáljunk?

Az immunogén, a rögzítés során visszafordíthatatlan károsodást nem szenvedő és a fajok széles körében állandósult epitópok csak véletlenszerűen esnek egybe. Kísérleteink során a CD43 fehérje állandósultnak jósolt szakasza alapján szintetizált CD43(352-372) peptid ellen termelt szérum állatorvosi diagnosztikai felhasználásra nem vált be, míg ugyanezen fehérje baktériumban termelt citoplazmatikus szakaszát felismerő szérum ilyen célokra alkalmasnak bizonyult. A kis méretű peptideken csak kevés epitóp helyezkedik el, peptidekkel ezért csak akkor célszerű immunizálni, ha valószínűsíteni tudjuk, hogy az epitópok között valóban van olyan, ami a három fentemlített követelménynek megfelel. Az immunizálást célszerűbb rekombináns fehérjékkel vagy fehérjedoménokkal végezni, hiszen a fehérjéken elhelyezkedő epitópok között nagy valószínűséggel lesznek olyanok is, amelyek lehetővé teszik a fajok széles körében, rögzített szöveteken felhasználható ellenanyagok képződését.

Sejten kívüli vagy sejten belüli epitópot hordozó antigénnel immunizáljunk?

Az állatorvosi szempontból fontos fajok széles körében megtalálható epitópok nagy valószínűséggel az immunizálásra felhasznált állatfajban is jelen vannak. Az ilyen állandósult, így az immunizálás során sajátuk felismert epitópok ellen az immunválasz gátolt. Ez különösen igaz az állandósult sejtfelszíni epitópok ellen kialakuló immunválaszra, hiszen a vérben keringő, fehérvérsejt-felszíni epitópokat felismerő ellenanyagok autoimmun választ indukálhatnak. Ez lehet talán annak az oka, hogy mind az emberi, mind az állati fehérvérsejt-felszíni epitópokat felismerő ellenanyagok csak kivételes esetben ismernek fel az állatok széles körében állandósult epitópokat. A sejten belüli állandósult epitópok ellen kialakuló immunválasznak nagyobb a valószínűsége, hiszen a vérben keringő ellenanyagok számára a sejten belüli antigének általában hozzáférhetetlenek. A p.aCD3 ϵ (177-190) szérum jó példa arra, hogy az immunizálásra felhasznált állatfajban is sejten belüli állandósult epitóp ellen kialakulhat immunválasz, ugyanis a szérum a nyúlban is alkalmasnak bizonyult a T-sejtek jelölésére.

A sejtfelszínről a sejtmag felé haladva a fehérjék egyre nagyobb állandósultságot mutatnak. Ez a tendencia a sejtfelszíni fehérjék egyes szakaszaira is igaz, ugyanis a sejtfelszíni fehérjék extracelluláris része rendszerint alacsonyabb homológiát mutat a

különböző fajok azonos fehérjéi között, mint a fehérjék sejten belüli része. Ez mindkét általunk vizsgált sejtfelszíni fehérje, a CD3ε és CD43 esetében is így volt.

A sejten belüli epitópokhoz viszonyítva a sejten kívüli epitópok a rögzítőszer immunreaktivitást károsan befolyásoló hatásának is jobban ki vannak téve, hiszen a szervek rögzítésekor a rögzítőszer először ezekkel az epitópokkal lép kölcsönhatásba.

Az előző érvek mind arra utalnak, hogy a sejten belüli epitópokat felismerő immunreagensek minden szempontból alkalmasabbnak tűnnek az állatorvosi rutindiagnosztikumokkal szemben támasztott követelmények teljesítésére.

6.3. A monoklonális ellenanyagok és az affinitás-tisztított szérumok előnyei és hátrányai

A monoklonális ellenanyagok általában egy, az affinitás-tisztított anti-peptid szérumok néhány, a teljes fehérjék vagy fehérjedomének ellen létrehozott affinitás-tisztított szérumok pedig sok epitópot ismernek fel. Mivel a kevés epitópot felismerő reagensek esetében kicsi a nem kívánt keresztreakció valószínűsége, a monoklonális ellenanyagok és az anti-peptid szérumok háttérmentesen működnek. Ezt tapasztaltuk az általunk vizsgált monoklonális ellenanyagok zöménél és a p.aCD3ε(177-190) anti-peptid szérum esetében is. A teljes fehérjékkel vagy fehérjedoménekkel történő immunizálással előállított szérumban ugyanakkor megnő a háttérrel adó keresztreakáló ellenanyagok képződésének a veszélye is. Valószínűleg a p.aCD43cp szérum alkalmazáskor tapasztalt nem zavaró háttérrel is ilyen keresztreakáló ellenanyagok okozták.

Amíg a monoklonális ellenanyag-preparátumok csak egyféle specificitású immunglobulinból állnak, addig a poliklonális szérumok az immunizálásra felhasznált antigént felismerő ellenanyagokon kívül az immunizálásra használt antigén szennyeződéseivel szemben termelődő, valamint az immunizált állat természetes immunfolyamatainak eredményeképpen létrejövő ellenanyagokat is tartalmaznak. Ezek az ellenanyagok a későbbi felhasználás során nem kívánt keresztreakciókat adhatnak, így a szérumok affinitás-tisztítása kívánatos. A természetes ellenanyagokat eltávolíthatjuk a szérum immunizálásra használt antigénnel konjugált oszlopon történő affinitástisztításával (pl. a p.aCD43(352-372) szérum affinitás-tisztítása CD43(352-372) peptiddel konjugált oszlopon). Az immunizálásra felhasznált antigén szennyeződéseit

felismerő ellenanyagok eltávolítására viszont olyan kerülő megoldásokat kell alkalmaznunk, amire az aCD43cp szérum affinitástisztításánál mutattam be példát.

A monoklonális ellenanyagok gyakorlatilag korlátlan mennyiségben azonos minőségben állíthatók elő, ami a napi gyakorlatban való alkalmazást megkönnyíti. A szérumok minősége viszont immunizálásenként változó, mert az egyes immunizált állatok az antigéneket különbözőképpen ismerik fel. A szérumok sarzsonkénti minőségi különbségei viszont megnehezítik az affinitás-tisztított szérumok felhasználásának egységesítését.

Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy az affinitás-tisztított szérumok (p.aCD3ε(177-190) és p.aCD43cp) előállítása is nagyon hatásos módja lehet az állatorvosi gyakorlatban felhasználható diagnosztikumokkal szemben támasztott követelményeknek megfelelő immunreagensek kifejlesztésének. Mivel azonban a monoklonális ellenanyagok szinte minden szempontból előnyösebb tulajdonságokkal rendelkeznek, mint az affinitás-tisztított szérumok, kívánatos a monoklonális ellenanyagok előállítása. Erre akkor van lehetőség ha az immunizált állatban a rögzített szöveteken alkalmazható, a fajok széles körében állandósult fehérvérsejt-epitópot felismerő ellenanyagot termelő B-sejtklónok viszonylag nagy mennyiségben vannak jelen. Ilyenkor ugyanis valós esély van arra, hogy ezeket a B-sejtklónokat immortalizálva megfelelő ellenanyagot termelő sejtvonalakat hozzunk létre.

A B-sejteken kifejeződő CD79 fehérje sejten belüli epitópját felismerő monoklonális ellenanyag az első olyan reagens, amely az állatfajok széles körében, rögzített szöveteken is alkalmazható (Jones és tsi. 1993). Mivel a p.aCD3ε(177-190) és a p.aCD43cp affinitás-tisztított szérumok ellenanyag-tartalmának jelentős része az állatorvosi rutindiagnosztikumokkal szemben támasztott követelményeknek eleget tesz, a jövőben lehetőség nyílik a CD3ε és a CD43 fehérjét felismerő, az állatorvosi gyakorlatban alkalmazható monoklonális ellenanyagok előállítására.

6.4. Végző

Az általunk és mások által kifejlesztett immunreagensek mindennapi állatorvosi gyakorlatban történő széleskörű alkalmazását ma még sok tényező gátolja.

A rögzítést sok esetben a kóreset helyszínén a területi állatorvosok végzik el saját belátásuk szerint. Az alkalmazott formaldehid oldat töménysége és pH-ja, valamint a rögzítés időtartama változó, azaz hiányzik a rögzítés körülményeinek a humán gyakorlatban már megtörtént egységesítése. A rögzítés körülményei a hagyományos szövettani módszereket nem befolyásolják lényegesen, az immunhisztokémiai módszereket azonban igen, az epitópok visszanyerhetősége ugyanis jelentősen függ ezektől a tényezőktől.

Az állati kóresetek diagnosztizálására felhasználható immunreagensekből rendelkezésre álló választék a legtöbb számításba jövő állatfaj esetén még mindig szűk, pedig a humán gyakorlatban bizonyítást nyert, hogy a megfelelően hatékony diagnózishoz többféle marker mintázatának egyidejű vizsgálata szükséges.

Az immunsejtek állati betegségekben betöltött szerepe még sok kórképben alig ismert, számos esetben csak a hasonló emberi kórképekben azonosított immunsejt-funkciók alapján következtethetünk rá. Mindezek alapján rövid távon arra van lehetőség, hogy az általunk kifejlesztett reagenseket visszatekintő elemzésekben alkalmazva a fehérvérsejtek különböző állati kórképekben betöltött szerepe világosabbá válhasson. Ezek a kísérletek pedig kijelölhetik az egyes immunreagensek helyét az állatorvosi rutindiagnosztikában.

*7. Angol nyelvű összefoglaló
(Summary in English)*

Identification and characterisation of immunoreagents that are applicable in fixed tissues of various animal species

The functional integrity of multicellular organisms is continuously jeopardised by multiple environmental constraints. The main role of the immune system is to protect that integrity against factors that exploit the resources of the host in the interest of their own survival and/or propagation, thereby causing danger, distress or damage to the host. The majority of immune functions in vertebrate animals are provided by the white blood cells which search for and recognise antigens, initiate an immune response and provide effector mechanisms to eliminate the danger source.

For decades the cell types that played major roles in the immune response were identified based on morphological criteria only. It was the development of the hybridoma technique that led to the characterisation of white blood cell surface antigens. These antigens, used as markers, established the major white blood cell lineages and enabled the distinction of different developmental stages and activation states. The use of reagents recognising white blood cell antigens in immunocytochemistry and immunohistochemistry allowed the detection of pathological changes in various immune cell subsets. The emergence of serological markers therefore also revolutionised the human pathological diagnosis.

The characterisation of the immune system at the molecular level in different animal species began parallel with the identification of human white blood cell antigens. Due to the large number of different animal species in proportion to the available resources, our knowledge on the structure and function of the immune system in animals is very limited. The amount of reagents recognising immune cells in animals is low, it is therefore not surprising that the immunodiagnostic methods play a minor role in veterinary practice as compared to human pathology.

The aim of this study was to produce and/or to characterise immunoreagents that would suit the needs of veterinarian diagnosis. As, unlike in human medicine, sampling and diagnosis is separated in time and space tissues are usually fixed and embedded which may lead to the decrease of the tissue immunoreactivity. In addition the veterinarian has to deal with many different animal species. The ideal immunoreagent should therefore not only reproducibly recognise immune cells in different animal species but it should recognise an epitope (or epitopes) that is (are) in one hand not irreversibly altered during the routine processing of the tissue samples and that on the other hand is (are) conserved in a wider

range of related species. In our experiments the applicability of immunoreagents generated by several different approaches was evaluated.

Monoclonal antibodies against extracellular epitopes of leukocyte surface antigens

In the scope of the Third International Workshop on Ruminant Leukocyte Antigens we studied monoclonal antibodies that recognised extracellular epitopes of bovine white blood cell surface antigens and that were produced by hybridoma cell lines generated by immortalisation of B lymphocyte clones from mice that were immunised with white blood cell suspensions from various ruminant animal species.

Out of three hundred and five monoclonal antibodies only thirty-eight gave reproducible staining patterns in bovine lymphoid tissues fixed in neutral buffered formalin. The specificity of our results are authenticated by the preliminary cytofluorimetric measurements and immunohistochemical experiments in frozen tissue specimens that, with some clear exceptions, gave concordant results. In most cases the presence and the quality of the staining was largely dependent on the application of various epitope retrieval methods prior to immunohistochemical labelling. As a result of our experiments a panel of antibodies was established that allowed the identification of all or distinct subpopulations of B and T lymphocytes, monocytes, macrophages, granulocytes, red blood cells and vascular endothelial cells in routinely processed bovine tissues.

The three hundred and five monoclonal antibodies were used to label leukocytes from different mammalian species. The proportion of the monoclonal antibodies reacting with the leukocytes of one particular species correlated well with the predicted evolutionary distance of the species to cattle as a closer evolutionary relationship was associated with a higher frequency of serological cross-reactivity. In the case of those ten monoclonal antibodies that marked leukocytes in all species tested we provided evidence that the recognised epitopes were confined to leukocyte populations with similar light scattering properties (lymphocytes, monocytes and granulocytes) and to antigens with similar molecular weights.

However, only two out of three hundred and five monoclonal antibodies (DH16, VPM36) recognised an epitope that undergoes no irreversible change upon routine fixation and processing and that is conserved in a wider variability of species (mammals) at the same time

Affinity purified antisera against intracellular epitopes of leukocyte surface antigens

The CD3 chains are invariable components of the T cell receptor complex that are responsible for transducing the signals to the cell generated by the ligation of the variable T cell receptor chains by the antigen. The CD3 transmembrane proteins are expressed by cells of the T lymphoid lineage including some of the closely related natural killer cell lineage. An affinity purified antiserum (p.aCD3 ϵ (177-190)) generated by Mason et al. against a peptide corresponding to amino acids 177-190 of the human CD3 ϵ chain was shown to detect T lymphocytes (and natural killer cells) in frozen as well as in formalin fixed paraffin embedded tissue specimens. The serum is widely used in human immunohistopathology to demonstrate T lymphoid origin of infiltrating cells in pathological tissues.

In recent years the amino acid sequence of the CD3 ϵ chain has been determined in many species. The comparison of these sequences revealed highly conserved amino acid stretches in the cytoplasmic tail of the protein, including the sequence against which the p.aCD3 ϵ 177-190 serum was raised. In western blot experiments the serum recognised proteins with similar molecular weights to the human CD3 ϵ protein in lysates prepared from different immune organs of many avian and mammalian species. The serum stained lymphoid cells in T cell regions of various lymphoid tissues from all avian and mammalian species tested in frozen and formalin fixed paraffin embedded tissue specimens. These results strongly suggest that the structure and the expression pattern of the CD3 ϵ chain is conserved in all avian and mammalian species.

To assess the possible veterinary applications of the p.aCD3 ϵ (177-190) serum we immunostained pathological tissue sections from cases that represented various forms of animal disease. In most instances CD3 ϵ + cells were readily observed, although the samples were collected up to ten years before the staining. We provided evidence that this antiserum is a useful tool for the serological characterisation of normal and pathological lymphoid tissues and infiltrations in both experimental work and animal disease.

The CD43 is a heavily O-glycosylated transmembrane protein that is expressed in all hematopoietic cell lineages except for red blood cells and mature B cells. The function of this protein is unknown, but it is postulated to participate in signal transduction and in adhesion events. The protein is known from human, mouse and rat only. The comparison of the CD43 sequences from these species indicated a high level of conservation in the cytoplasmic domain.

A serum was raised against a peptide that corresponded to amino acids 352.-372. of the human CD43 protein, a cytoplasmic sequence that was shown to be highly conserved in human, mouse and rat. The subsequently affinity purified serum (p.aCD43(352-372)) did not stain permeabilised CD43- P3HR1 cells and failed to detect any proteins from the lysate of this cell line in Western blot experiments. In contrast, this reagent strongly labelled the CD43+ Jurkat cell membranes which was inhibitable with the peptide used for immunisation in a dose dependent manner. In Western blot experiments the serum detected a protein with identical molecular weight to the CD43 from the Jurkat cell lysate. This clearly showed that the p.aCD43(352-372) serum recognised the cytoplasmic tail of the CD43 protein. Due to the extremely low CD43(352-372) peptide titers, however, the application of this serum for veterinary diagnostic purposes was unfeasible.

In an alternative approach we produced a GST fusion protein containing the cytoplasmic tail of the human CD43. The structure of the recombinant protein was verified by western blotting and mass spectroscopy. An antiserum was raised against the recombinant cytoplasmic tail of the CD43 molecule and subsequently affinity purified (p.aCD43cp). In immunoprecipitation and western blotting experiments we found that the antigen recognised by the serum had a molecular mass identical to that of human CD43. The affinity purified serum labelled permeabilised human CD43+ but not CD43- cell lines. In double labelling experiments we demonstrated that T lymphocytes and monocytes are strongly labelled while B lymphocytes express no or very little protein recognised by the p.aCD43cp serum in human. Convincingly, the same cell types were stained in lymphoid tissues in immunohistochemical studies. These results provided evidence for the applicability of the p.aCD43cp serum to detect the human CD43 protein in native and denatured forms.

In the next step we investigated whether the high level of conservation in the CD43 cytoplasmic domain among the species could be demonstrated on a serological level. In western blot experiments the serum was able to detect a protein corresponding to CD43 in human and mouse but not in other species tested. In immunocytochemical and immunohistochemical experiments, however, the serum recognised T lymphocytes and myeloid cells of many mammalian species. The p.aCD43cp serum enabled the identification and partial characterisation of the CD43 in many species in which the CD43 protein was previously unknown. The biochemical and immunohistochemical evidence strongly suggests that the structure and expression pattern of the CD43 chain is conserved in many mammalian species.

In most cases CD43⁺ cells were readily observed in pathological tissues representing many different forms of animal disease, even if the samples had been collected ten years before. The p.aCD43cp serum is therefore a reliable reagent for the verification of the hematopoietic origin of different infiltrations and, used together with other reagents, for the serological characterisation of normal and pathological lymphoid tissues and lymphoid infiltrations in experimental work and in animal disease.

In conclusion we found reagents that satisfied our expectations among both monoclonal antibodies recognising leukocyte cell surface epitopes and affinity purified antisera recognising intracellular epitopes of leukocyte antigens. The experience obtained with the immunoreagents produced and/or characterised by us allowed the comparison of the advantages and disadvantages of the different approaches to produce diagnostic reagents for veterinary routine purposes.

When immunising with a mixture of proteins (e.g. cell suspensions) the immune response is directed only occasionally against epitopes that undergo no irreversible change upon fixation and embedding and that are conserved in a wider variety of animal species. Most immunoreagents that were produced using this approach (e.g. monoclonal antibodies against extracellular epitopes of bovine leukocyte cell surface antigens) suited rarely the needs of routine veterinary pathology.

If information on the sequence of leukocyte cell surface proteins is available, peptides can be synthesised or proteins or protein domains can be expressed in a suitable expression system. The results obtained with affinity purified antisera raised against peptides and recombinant proteins more promising. Anti-peptide sera like p.aCD3ε(177-190), may be highly applicable for routine veterinary purposes if the peptide that is designed to represent evolutionary conserved stretches of proteins proves to be immunogenic on one hand, and on the other hand the epitopes recognised by the generated sera undergo no irreversible changes upon routine processing. If these requirements are not met, as happened with the p.aCD43(352-372), it is advisable to use whole proteins or protein domains produced by tools of molecular biology for the immunisation. Whole proteins or protein domains represent all epitopes including the conformational ones. A serum generated against some of the epitopes may fulfil the objectives set for an ideal veterinary immunoreagent. Our experience with the p.aCD43cp serum is a good example for the applicability of this latter approach.

8. Rövidítések jegyzéke

ATP - adenosine-triphosphate - adenzin-trifoszfát
BCR - B cell receptor - B-sejt receptor
BSA - bovine serum albumin - szarvasmarha szérumalbumin
CD - Cluster defined
cDNS - komplementer cDNS (complementary DNA)
Coomassie BB - Coomassie Brilliant Blue
dH₂O - desztillált víz
DN-áz - dezoxsziribonukleáz
DNS - dezoxiribonukleinsav
EDTA - ethylene-diamine-tetraacetic acid - etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA - ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether) N',N',N',N' - tetraacetic acid
ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC - fluorescein isothiocyanate - fluoreszcein-izotiocianát
FCS - foetal calf serum - magzati borjúsavó
FSC - Forward Scatter - előre irányuló fényszórás
HPLC - High Pressure Liquid Chromatography- magas nyomású foly.kromatográfia
IPTG - isopropyl β-D-thiogalactopyranoside - izopropil β-D-tiogalaktopiranozid
ITAM - Immunoreceptor Tirozin-alapú Aktivációs Motívum
G.S. - Glutathion- Sepharose
GST - Glutathion-S-Transzferáz
mEa - monoklonális ellenanyag
MHC - Major Histocompatibility Complex - Fő Hisztokompatibilitási Csoport
NK - natural killer cells - természetes ölősejt
NPF - neutrális pufferelt formalin
OD - optical density - optikai denzitás
OPD - ortho-phenylene-diamine - Orto-fenilén-diamin
PAGE - polyacrilamide gel electrophoresis - poliakrilamid gélelektroforézis
PBM - peripheral blood mononuclear cells - perifériás vér mononukleáris sejtek
PBS - phosphate buffered saline - foszfátokkal pufferelt fiziológias sóoldat
PCR - polymerase chain reaction - polimeráz lánreakció
PE - r-Phycoerythrin - r-fikoeritrin
PI - Propidium iodide - propídium - jodid
PIPES - (piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid])
RAG - recombination activating gene - rekombinációt aktiváló gén
RN-áz -ribonukleáz
RNS -ribonukleinsav
SCID - severe Combined Immunodeficiency - súlyos kombinált immunhiányos állapot
SDS - sodium dodecyl sulphate - nátrium-dodecil-szulfát
SH - src homology domain - src homológ domén
SSC -side scatter - oldalirányú fényszórás
TBE - Tris buffered EDTA - Tris-szel pufferelt EDTA
TBS - Tris buffered saline - Tris-szel pufferelt fiziológias sóoldat
TCR - T cell receptor - T-sejt receptor
Tris - Tris(hydroxymethyl)aminomethane - Trisz(hidroximetil)aminometán
WC - Workshop cluster

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni a munkámhoz nyújtott segítséget

az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének Immunológiai Csoportjából

Andó Istvánnak, a témavezetésért és a kísérleteimhez szükséges források biztosításáért, *Hegedűs Zoltánnak* a GST fúziós fehérjék túltermelésében szerzett tapasztalatainak átadásáért, *Kurucz Évának* az általa elvégzett Western blot kísérlet eredményének (5.2.2. fejezet) munkámban való felhasználásának engedélyezéséért, *Monostori Évának* az immunkémiai módszerek elsajátításához nyújtott segítségért, *Szlanka Tamásnak* a pTS1/14.5 plazmidkonstrukció átadásáért, és a PCR reakció optimalizálásáért (5.4.1. fejezet), *Vilmos Péternek* az általa elvégzett áramlási citometriai és Western blot kísérletek eredményeinek (5.1.3. fejezet) munkámban való felhasználásának engedélyezéséért, továbbá *Bálint Aránaknak*, *Bogdán Istvánnaknak*, *Debreczeni Ildikónak*, *Lukács Teréziának*, *Nagy Istvánnaknak*, *Székely-Szűts Kingának*, *Tápai Szilviának* és *Végh Gabriellának* a lelkiismeretes laborasszisztensi munkájukért,

a Szentgyörgyi Albert Orvostudományi Egyetem Patológiai Intézetéből

Krenács Lászlónak az immunhisztokémiai módszerek elsajátításához nyújtott segítségért, *Krenács Tibornak* az epitóp visszanyerési módszerek megértéséhez nyújtott segítségért valamint *Lábdy Máriának* és *Dudás Ágnesnek* lelkiismeretes laborasszisztensi munkájukért,

a SZOTE Biokémiai Intézetéből

Ocsovszki Imrének az áramlási citofluoriméterrel végzett mérésekért,

a SZOTE Orvosi Vegytani Intézetéből

Tóth Gábornak a CD43(352-372) peptid szintéziséért és a peptid hordozóhoz való kötéséért, *Kele Zoltánnak* és *Szabó Pálnak* a tömegspektrométerrel végzett mérésekért,

a Magyar Országos Állategészségügyi Intézetből (Budapest)

Glávits Róbertnek az állatorvosi patológiás anyag kiválogatásában és kiértékelésében nyújtott segítségéért,

az Amgen Inc. kutató intézetből (California, USA)

Takács Lászlónak a limfoid szerveken végzett immunhisztokémiai vizsgálatok kiértékelésében nyújtott eligazításaiért,

illetve mindazoknak, akik tanácsokkal, vegyszerekkel vagy egyéb módon járultak hozzá ennek a dolgozatom megszületéséhez.

10. Az értekezésben felhasznált közlemények

Kurucz E., Glávits R., Krenács L., Krenács T., Ocsovszki I., **Keresztes G.**, Monostori E. and Andó I.: An antiserum reacts with an evolutionary conserved region in the ϵ subunit of the T-cell receptor-CD3 complex in phylogenetically distant species *Immunol.Letters* 38:177 (1993)

Keresztes G., Glávits R., Krenács L., Kurucz É. and Andó I.: An anti-CD3 ϵ serum detects T lymphocytes in paraffin-embedded pathological tissues in many animal species *Immunol.Letters* 50:167 (1996)

Keresztes G., Takács L., Vilmos P., Kurucz E. and Andó I.: Monoclonal antibodies detecting components of the bovine immune system in formaldehyde fixed paraffin-embedded tissue specimens *Vet.Immunol.Immunopathol.* 52:383 (1996)

Vilmos P., Kurucz E., Ocsovszki I., **Keresztes G.**, and Andó I.: Phylogenetically conserved epitopes of leukocyte antigens *Vet.Immunol.Immunopathol.* 52:415 (1996)

Keresztes G., Szlanka T., Vilmos P., Tóth G., Ocsovszki I. and Andó I.: An antiserum raised against the recombinant cytoplasmic tail of the human CD43 glycoprotein identifies CD43 in many mammalian species - kézirat készülében

11. Idézett irodalom

- Allison J.O., McIntyre B.W. & Bloch D.: Tumor specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody *J.Immunol.* 129:2293 (1982)
- Amorena B. & Stone W.H.: Serologically defined (SD) locus in cattle *Science* 201:159 (1978)
- Andó I., Zákány J., Takács L., Petri I., Kaiser G., Veres G., Balázs L., Nikolova E.B., Beverley P.C.L. & Monostori E.: The use of monoclonal antibodies to dissect the human haemopoietic and lymphoreticular system In: *Tissue Culture and RES.* eds. Röhlich et al., Amsterdam Academic Press Elsevier, Holland (1984)
- Andó I., Ramadan H., Bogdán G., Vilmos P. & Monostori E.: Induction of cell aggregation by the workshop adhesion structure subpanel 9 (CD43) mAbs in *Leukocyte typing V.* eds S.F. Sclossman et al., Oxford University Press pp.1711-1712 (1995)
- Ardman B., Sikorski M.A. & Staunton D.E.: CD43 interferes with T-lymphocyte adhesion *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 89:5001 (1992)
- Axelsson B., Kimura A., Hammarström S., Wigzell H., Nilsson K. & Mellstedt H.: Helix pomatia A hemagglutinin: selectivity of binding to lymphocyte surface glycoproteins on T cells and certain B cells *Eur. J. Immunol.* 5: 757 (1978)
- Axelsson B., Hammarström S., Robertsson E-S., Aman P., Perlmann P. & Mellstedt H.: The large sialoglycoprotein of human lymphocytes, I. Distribution on T and B lineage cells as revealed by a monospecific chicken antibody *Eur. J. Immunol.* 15:417 (1985)
- Axelsson B., Youseffi-Etemad R., Hammarström S. & Perlmann P.: Induction of aggregation and enhancement of proliferation and IL-2 secretion in human T cells by antibodies to CD43 *J. Immunol.* 141:2912 (1988)
- Baldwin C.L., Teale A.J., Naessens J.G., Goddeeris B.M., MacHugh N.D. & Morrison W.I.: Characterization of a subset of bovine T lymphocytes that express BoT4 by monoclonal antibodies and function: similarity to lymphocytes defined by human T4 and murine L3T4 *J.Immunol.* 136:4385 (1986)
- Bembridge G.P., Howard C.J., Parsons J.R. & Sopp P.: Identification of monoclonal antibodies specific for bovine Leukocyte Common Antigen (CD45) together with a novel broadly expressed leukocytes differentiation antigen BoWC11 *Vet.Immunol.Immunopathol.* 39:115 (1993)
- Bertram E.M., Wilkinson R.G., Lee B.A., Jilbert A.R. & Kotlarsik I.: Identification of duck T lymphocytes using an anti-human T cell (CD3) antiserum *Vet.Immunol.Immunopathol.* 51:353 (1996)
- Biassoni R., Ferrini S., Prigione I., Moretta A. & Long E.O.: CD3 negative lymphokine activated cytotoxic cells express the CD3 ϵ gene *J.Immunol.* 140:1685 (1988)
- Borche L., Lozano F., Vilella R. & Vives J.: CD43 monoclonal antibody recognize the large sialoglycoprotein of human leukocytes *Eur. J. Immunol.* 27:1523 (1987)

Boyum A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 21:1 (1968)

Brenner M.B., McLean J., Dialynas D.P., Strominger J.C., Smith J.A., Owen F.L., Seidman J.G., Ip S., Rosen F. & Krangel M.S.: Identification of a putative second T cell receptor *Nature* 322:145 (1986)

Brown W.R.A., Barclay A.N., Sunderland C.A. & Williams A.F.: Identification of a glycoprotein-like molecule at the cell surface of rat thymocytes *Nature* 289:456 (1981)

Brozman M.: Immunohistochemical analyses of formaldehyde and trypsin- or pepsin-treated material *Acta Histochem.* 63:251 (1978)

Bucy R., Chen C.H., & Cooper M.D.: Development of cytoplasmic CD3⁻/T cell receptor-negative cells in the peripheral lymphoid tissues of chickens *Eur.J.Immunol.* 20:1345 (1990)

Cantor H. & Boyse E.A.: Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens: I. The generation of functionally distinct T cell subclasses is a differentiative process independent of antigen *J.Exp.Med.* 82:1376 (1975)

Carlsson S.R. & Fukuda M.: Isolation and Characterization of Leukosialin, a Major Sialoglycoprotein on Human Leukocytes *J.Biol.Chem.* 261:12779 (1986)

Cattoretti G., Pileri S., Parravicini C., Becker M.H.G., Poggi S., Bifulco C., Key G., D'amato L., Sabattini E., Feudale E., Reynolds F., Gerdes J. & Rilke F.: Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections *J.Pathol* 171:83 (1993)

Chan M.M.; Chen C.L.; Ager L.L. & Cooper M.D.: Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens *J.Immunol.* 140: 2133 (1988)

Chang J.Y.: Thrombin specificity. Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate *Eur.J.Biochem.* 151:217 (1985)

Chardon P., Vaiman M., Renard C. & Arnoux B.: Pig histocompatibility antigen and β 2 microglobulin *Transplantation* 26:107 (1978)

Chen C.H., Ager L., Gartland G.L. & Cooper M.D.: Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens *J.Exp.Med.* 164:375 (1986)

Clevers H., Alarcon B., Wileman T. & Terhorst C.: The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble *Annu. Rev. Immunol.* 6: 629 (1988)

Clevers H., Dunlap S., Saito H., Georgopoulos K., Wileman T. & Terhorst C.: Characterization and expression of the murine CD3 ϵ gene *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 85:8623 (1988).

Conzelmann A., Pink R., Acuto O., Mach J.O., Dolivo S. & Nabholz M.: Presence of T-145 on cytolytic T-cell lines and their lectin-resistant mutants *Eur.J.Immunol.* 10:860 (1980)

Crone M., Simonsen M., Skjodt K., Linnet K. & Olsson L.: Mouse monoclonal antibodies to class I and class II antigens of the chicken MHC - evidence for at least two class I products of the B complex *Immunogenet.* 21:181 (1985)

Cullen S.E., Avid C.S., Schreffler D.C. & Nathenson S.G.: Membrane molecules determined by the H2 associated immune response region: isolation and some properties *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 71:648 (1974)

Cyster J.G., Somoza C., Killeen N. & Williams A.F.: Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence *Eur. J. Immunol.* 20: 875 (1990)

Cyster J.G., Shotton D.M. & Williams A.F.: The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycolisation *EMBO J.* 10:893 (1991)

Cyster J.G. & Williams A.F.: The importance of cross-linking in the homotypic aggregation of lymphocytes induced by anti-leukosialin (CD43) antibodies *Eur.J.Immunol.* 22:2565 (1992)

Davis W.C., MacHugh N.D., Park Y.H., Hamilton M.J. & Wyatt C.R.: Identification of a monoclonal antibody reactive with the bovine orthologue of CD3 (BoCD3) *Vet.Immunol.Immunopath.* 39:85 (1993)

DeLellis R.R. & Kwan P.: Technical considerations in the immunohistochemical demonstration of intermediate filaments *Am.J.Surg.Pathol.* 12 (Suppl.1):17 (1988)

Dialynas D.P., Quan Z.S., Wall K.A., Pierres A., Quintans J., Loken M.R., Pierres M. & Fitch J.: Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK 1.5: similarity of L3T4 to the human Leu3/T4 molecule *J.Immunol.* 131:2445 (1983)

Den Hanz S., Shimizu M., Bianchi A.T.J., Zwart R.J., Carr M.M., Parkhouse R.M.E.: Monoclonal antibodies recognizing differentiation antigens on porcine B cells *Vet.Immunol.Immunopathol.* 43:259 (1994)

Ellis J.A., Baldwin C.L., MacHugh N.D., Bensaid A., Teate A.J., Goddeeris B.M. & Morrison W.I.: Characterization by a monoclonal antibody and functional analysis of a subset of bovine T lymphocytes that express BoT8, a molecule analogous to human CD8 *Immunology* 58:351 (1986)

Ewert D.L., Munchus M.S., Chen C.H. & Cooper M.D.: Analysis of structural properties and cellular distribution of avian Ia antigen by using monoclonal antibody to monomorphic determinants *J.Immunol.* 132:2524 (1984)

- Fernandez-Patron C., Calero M., Collazo P.R., Garcia J.R., Madrazo J., Musacchio A., Soriano F., Estrada R., Rainer F., Castellanos-Serra L. & Mendez E.: Protein reverse staining: High-efficiency microanalysis of unmodified proteins detected on electrophoresis gels *Anal.Biochem.* 224:203 (1995)
- Ferrer J.F., Marshak R. & Kenyon S.J.: Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle *J.Vet.Med.Assoc.* 175:705 (1979)
- Fingerroth J.D., Benedict M.A., Levy D.N. & Strominger J.L.: Identification of murine complement receptor type 2 *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 86:242 (1989)
- Finley, J.W.C., Bullock G.R. & Petrusz P.: The use of proteolytic enzymes for improved localization of tissue antigens with immunocytochemistry In: *Techniques in Immunohistochemistry*, eds. Petrusz P., Academic Press, London pp. 239-249 (1982)
- Foon K.A., Schroff R.W. & Gale R.P.: Surface markers on leukemia and lymphoma cells: Recent advances *Blood* 60:1 (1982)
- Fox C.H., Johnson F.B., Whiting J. & Roller P.P.: Formaldehyde fixation *J.Histochem.Cytochem.* 33:845 (1985)
- Gold D.P., Puck J.M., Pettey C.I., Cho M., Coligan J., Woody J. & Terhorst C.: Isolation of cDNA clones encoding the 20kD non-glycosylated polypeptide chain of human T cell receptor-CD3 complex *Nature* 321:431 (1986)
- Gold D.P., Clevers H., Alarcon B., Dunlap S., Novotny J., Williams A.F. & Terhorst C.: Evolutionary relationship between the T3 chains of the T cell receptor complex and the immunoglobulin supergene family *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 84:383 (1987).
- Hagens G., Galley Y., Glaser I., Davis W.C., Baldwin C.L., Clevers H. & Dobbelaere D.A.E.: Cloning, sequencing and expression of the bovine CD3 ϵ and TCR- ζ chains, two invariant components of the T-cell receptor complex *Gene* 169:165 (1996)
- Hakes D.J. & Dixon J.E.: New vectors for high level expression of recombinant proteins in bacteria *Anal.Biochem.* 202:293 (1992)
- Hein W.C. & Tunnacliffe A.: Invariant components of the sheep T-cell antigen receptor: cloning of the CD3 ϵ and TCR ζ chains *Immunogenet.* 37:279 (1993)
- Hirt W., Saalmüller A. & Reddehase M.J.: Distinct γ/δ T cell receptors define two subsets of circulating porcine CD2-CD4-CD5- T lymphocytes *Eur.J.Immunol.* 20:265 (1990)
- Hombach J.; Leclercq L.; Radbruch A.; Rajewsky K. & Reth M.: A novel 34-kd protein co-isolated with the IgM molecule in surface IgM-expressing cells *EMBO J.* 7: 3451 (1988)
- Houssaint E., Tobin S., Cihak J. & Löscher U.: A chicken leukocyte common antigen: biochemical characterization and ontogenic study *Eur.J.Immunol.* 17:287 (1987)

Hsu S.M.: The use of monoclonal antibodies and immunohistochemical techniques in lymphomas: Review and outlook *Haematol.Pathol.* 2:183 (1988)

Humphreys R.E., MaCune J.M., Chess L., Herrman H.C., Malenka D.J., Mann D.L., Parham P., Schlossman S.F. & Strominger J.L.: Isolation and immunologic characterization of a human B lymphocyte specific, cell surface antigen *J.Exp.Med.* 144:98 (1976)

Inoue H., Nojima H. & Okayama H.: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids *Gene* 96:23 (1990)

Jacobs H., Vandeputte D., Tolkamp L., deVries E., Borst J. & Berns A.: CD3 components at the surface of pro-T cells can mediate pre-T cell development in vivo *Eur.J.Immunol.* 24:934 (1994)

Jondal M., Klein G., Oldstone M., Bokish V. & Yefenof E.: Surface markers on human B and T lymphocytes VIII: association between complement and EBV receptors on human lymphoid cells *Scand.J.Immunol.* 5:401 (1976)

Jones A.T., Federspiel B., Ellies L.G., Williams M.J., Burgener R., Duronio V., Smith C.A., Takei F & Zitener H.: Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes *J.Immunol.* 151:3426 (1994)

Jones M., Cordell J.L., Beyers A.D., Tse A.G.D. & Mason D.Y.: Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies *J.Immunol.* 150:5429 (1993)

Jonjic S. & Koszinowski V.H.: Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. I. Antibodies to membrane structures that define the cytotoxic T lymphocyte subset in swine *J.Immunol.* 133:647 (1984)

Killeen N., Barclay A.N., Willis A.C. & Williams A.F.: The sequence of rat leukosialin (W3/13 antigen) reveals a molecule with O-linked glycosylation of one third of its extracellular amino acids *EMBO J.* 6:4029 (1987)

Kirkham P.A., Takamatsu H., Yang H. & Parkhouse R.M.: Porcine CD3 epsilon: its characterization, expression and involvement in activation of porcine T lymphocytes *Immunology* 87:616 (1996)

Kitamoto Y. & Maeda: Reevaluation of the reaction of formaldehyde at low concentration with amino acid *J.Biochem.* 87:1519 (1980)

Köhler G. & Milstein C.: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity *Nature* 256:495 (1975)

Kudo S. & Fukuda M.: A short novel promoter sequence confers the expression of human leukosialin, a major sialoglycoprotein on leukocytes *J.Biol.Chem.* 266:8483 (1991)

Kung P.C., Goldstein G., Reinherz E. & Schlossman S.F.: Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens *Science* 206:347 (1979)

Kurtin P.J. & Pinkus G.S.: Leukocyte common antigen – a diagnostic discriminant between hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies: correlation with immunologic studies and ultrastructural localization *Hum.Pathol.* 16:353 (1985)

Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227:680 (1970)

Lahti J.M.; Chen C.L.; Sowder J.T.; Bucy R.P. & Cooper M.D.: Characterization of the avian T cell receptor *Immunol.Res.* 7: 303 (1988)

Letourneur F. & Klausner R.D.: Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 ϵ *Science* 255:79 (1992)

Levelt C.N., Mombaerts P., Iglesias A., Tonegawa S. & Eichmann K.: Restoration of early thymocyte differentiation in T-cell receptor β chain deficient mutant mice by transmembrane signaling through CD3 ϵ *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 90:11401 (1993)

Linder J., Armitage J.O. & Weisenburger D.D.: Monoclonal antibodies marking T and B lymphocytes in paraffin-embedded tissue In: McMichel A.J. (editor), *Leukocyte Typing III.* Oxford University Press, Oxford p.297 (1987a)

Linder J., Ye Y., Harrington D.S., Armitage J.O. & Weisenburger D.D.: Monoclonal antibodies marking T and B lymphocytes in paraffin-embedded tissue *Am.J.Pathol.* 127:1 (1987b)

Lunney J.K. & Sachs S.M.: Transplantation in miniature swine. IV. Chemical characterization of MSLA Ia like antigens *J.Immunol.* 120:607 (1978)

Lunney J.K., Walker K. & Goldman T.: Analyses of anti-human CD monoclonal antibodies for cross reactions with swine cell antigens *Vet.Immunol.Immunopathol.* 43:207 (1994)

Mackay C.R.; Hein W.R.: A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int.Immunol.* 1: 540 (1989)

Malissen M., Gillet A., Ardouin L., Bouvier G., Trucy J., Ferrier P., Vivier E. & Malissen B: Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3 epsilon gene *EMBO J.* 14:4641 (1995)

Manjunath N., Correa M., Ardman M. & Ardman B.: Negative regulation of cell adhesion and activation by CD43 *Nature* 377:535 (1995)

Manolios N., Letourneur F., Bonifacino J.S. & Klausner R.D.: Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor *EMBO J.* 10: 1643 (1991)

Mason D.Y.: A new look at lymphoma immunohistology *Am.J.Pathol.* 128:1 (1987)

Mason D.Y., Cordell J., Brown M., Pallesen ., Ralfkiaer E., Rothbard J., Crumpton M. & Gatter K.C.: Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen *J.Clin.Pathol.* 42:1194 (1989)

Matsudaira P.T. & Burgess D.R.: SDS microslab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis *Anal.Biochem.* 87:386 (1978)

Matzinger P.: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu.Rev.Immunol.* 12:991 (1994)

Mentzer S.J., Remold-O'Donnell E., Grimmins M.A.V., Bierer B.E. & Rosen F.S., Burakoff S.J.: Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich Syndrome is involved in human T lymphocyte proliferation *J.Exp.Med.* 165:1383 (1987)

Merrifield, R. B.: The synthesis of a tetra peptide. Solid phase peptide synthesis. *J.Amer.Chem.Soc.* 85:2149 (1963)

Meuer S.C., Fitzgerald K.A., Hussey R.E., Hodgdon J.C., Schlossman S.F. & Reinherz E.L.: Clonotypic structures involved in antigen specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex *J.Exp.Med.* 157:705 (1983)

Monostori E., Szűcs P., Veres G. & Andó I.: Anyai szérum alfa-fetoprotein mérése monoklonális ellenanyagok segítségével, ELISA módszerrel *Orvosi Hetilap* 125:325 (1984)

Naessens J. & Hopkins J.: Introduction and summary of workshop findings *Vet.Immunol.Immunopathol.* 52:213 (1996)

Naessens J., Newson J., MacHugh N.D., Howard C.J., Parsons K.R. & Jones B.V.: Characterization of a bovine leukocyte differentiation antigen of 145,000 Mr restricted to B lymphocytes *Immunology* 69:525 (1990)

Nash R., Scherf U. & Sterb R.: Molecular cloning of the CD3 ϵ subunit of the TCR-CD3 complex in dog *Immunogenetics* 33:396 (1991)

Nong Y., Remold-O'Donnell E., LeBien T.W. & Remold H.G.: A monoclonal antibody to sialophorin (CD43) induces homotypic adhesion and activation of human monocytes *J.Exp.Med.* 170:259 (1989)

Norton A.J., Jordan S. & Yeomans P.: Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues *J.Pathol.* 173:371 (1994)

Oettingen H.C., Pettey C.L., Maloy W.L. & Terhorst C.: A T3-like protein complex associated with the antigen receptor on murine cells *Nature* 320:272 (1986)

Omary M.B., Trowbridge I.S. & Battifora H.A.: Human homologue of murine T200 glycoprotein *J.Exp.Med.* 152:842 (1980)

Pallant A., Eskenazi A., Mattei M.G., Fournier R.E.K., Carlsson S.R., Fukuda M. & Frelinger J.G.: Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1328 (1989)

Palutke M., Schnitzer B. & Mirchandani I.: T and B-cell lymphomas look alike *Am.J.Clin.Pathol.* 85:494 (1986)

Parravicini C.L., Vago L., Berti E., Cattoretti G., Delia D. & Soligo M.: Reactivity of common leukocyte panel monoclonal antibodies in normal human lymph node, thymus, spleen, lung, liver, brain, kidney and skin. Immunohistochemical study on paraffin sections with or without enzymatic digestion. In: *Leukocyte Typing III.*, eds. McMichel A.J. et al., Oxford University Press, Oxford p.822 (1987)

Pescovitz M.D., Lunney J.K. & Sachs D.H.: Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL *J.Immunol.* 133:368 (1984)

Poncelot P. és Caryon P.: Cytofluorimetric quantification of cell surface antigens by immunofluorescence using monoclonal antibodies *Br.J.Haematol.* 85:65 (1985)

Poppema S, Bhan K és Rheinherz E.L.: In situ immunologic characterization of cellular constituents in lymph nodes and spleens involved by Hodgkin's disease *Blood* 59:226 (1982)

Reinherz E.L., Kung P.C., Goldstein G. & Schlossman S.F.: Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 76:4061 (1979)

Reinherz E.L., Kung P.C., Goldstein G. & Schlossman S.F.: A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/suppressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum termed Th₂ *J.Immunol.* 124:1301 (1980)

Remold-O'Donnell E., Davis III A.E., Kenney D., Bhaskar K.R. & Rosen F.S.: Purification and Chemical Composition of gpL115, the Human Lymphocyte Surface Sialoglycoprotein That Is Defective in Wiskott-Aldrich Syndrome *J.Biol.Chem.* 261:7526 (1986)

Remold-O'Donnell E., Zimmermann C., Kenney D. & Rosen S.F.: Expression on Blood Cells of Sialophorin, the Surface Glycoprotein That Is Defective in Wiskott-Aldrich Syndrome *Blood* 70:104 (1987)

Renard V., Ardouin L., Malissen M., Milon G., Lebastard M., Gillet A., Malissen B. & Vivier E. Normal development and function of natural killer cells in CD3ε^{Δ5/Δ5} mutant mouse *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 92:7545 (1995)

- Reth M.: Antigen receptor tail clue *Nature* 338:383 (1989)
- Robbins B.A.: Diagnostic immunohistochemistry of lymphoma and related disorders: Practical aspects of frozen section technique and interpretation *J.Clin.Lab.Anal.* 1:104 (1987)
- Rodewald H.R., Moingeon P., Lucich J.L., Dosiou C., Lopez P. & Reinherz P.L.: A population of early fetal thymocytes expressing Fc gamma RII/III contains precursors of T lymphocyte and natural killer cells *Cell* 69:139 (1992)
- Rosenstein Y.J., Park J.K., Hahn W.C., Rosen F.S., Bierer B.E., Rosen F.S. & Burakoff S.J.: CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1 *Nature* 354:233 (1991)
- Rouse B.T., Wells R.J.H. & Warner H.L.: Proportion of T and B lymphocytes in lesions of Marek's disease: Theoretical implications for pathogenesis *J.Immunol.* 110:534 (1973)
- Saalmüller A., Hirt W. & Reddehase M.J.: Porcine γ/δ T lymphocyte subsets differing in their propensities to home to lymphoid tissue *Eur.J.Immunol.* 20:2343 (1990)
- Saito H., Kranz D.M., Takagaki Y., Hayday A.C., Eisen H.N. & Tonegawa S.: Complete primary structure of a heterodimeric T cell receptor deduced from cDNA sequences *Nature* 309:757 (1984)
- Sakaguchi N., Kashiwamura S., Kimoto M., Thalmann P. & Melchers F.: B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties. *EMBO J.* 7: 3457:64 (1988)
- Samelson L.E., Phillips A.F., Luong E.T. & Klausner R.D.: Association of the fyn tyrosine kinase with the T cell antigen receptor *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 87:4358 (1990)
- Sancho J., Franco R., Chatila T., Hall C. & Terhorst C.: The T cell receptor associated CD3 ϵ protein is phosphorylated upon T cell activation in the two tyrosine residues of a conserved signal transduction motif *Eur.J.Immunol.* 23:1636 (1993)
- Schubert H.J., Beer A., Rabe H.U. & Leibold W.: Reactivity of workshop antibodies with a non-ruminant species: crossreactivity with canine blood leukocytes *Vet.Immunol.Immunopathol.* 52:427 (1996)
- Sharp P.A., Sudgen B. & Sambrook J.: Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose *Biochemistry* 12:3055 (1973)
- Shelley C.S., Remold-O'Donnell E, Rosen F. & Whitehead A.S.: Structure of the human sialophorin (CD43) gene *Biochem. J.* 270: 569 (1990)

- Sherman M.Y. & Goldberg A.L.: Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli* *EMBO J.* 11:71 (1992)
- Shi S.R., Key M.E. & Klara K.L.: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections *J.Histochem.Cytochem.* 34:741 (1991)
- Shi S.R., Chaiwun B., Young L., Cote R.J. & Taylor C.R. : Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections *J.Histochem.Cytochem.* 41:1599 (1993)
- Shimizu Y. & Shaw S.: Mucins in the main stream *Nature* 366:630 (1993)
- Sowder J.T.; Chen C.L.; Ager L.L.; Chan M.M. & Cooper M.D.: A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor *J.Exp.Med.* 167:315 (1988)
- Spieler P., Kradolfer D. & Schmid U.: Immunocytochemical characterization of lymphocytes in benign and malignant lymphocyte-rich serous effusion *Virchows Arch.A.* 409:211 (1986)
- Sun N.E., Shen B.H., Zhou J.M., Yuan J., Xu X.X., Zhu D.X. & Han K.K.: An efficient method for large-scale isolation of plasmid DNAs by heat-alkali co-denaturation *DNA and Cell Biology* 13:83 (1994)
- Swanson S., Innes D.J., Frierson H.: T-immunoblastic lymphoma mimicking B-immunoblastic lymphoma *Arch.Pathol.Lab.Med.* 111:1077 (1987)
- Tonigaki N., Migakawa Y., Yagi Y. & Pressman D.: HL-A antigen from hematopoietic cell lines: molecular size and electrophoretic mobility *J.Immunol.* 107:402 (1971)
- Trowbridge I.S., Ralph P. & Bevan M.J.: Differences in the surface proteins of mouse B and T cells *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 72:157 (1975)
- Usinger W.R., Curie-Cohen M. & Stone W.H.: Lymphocyte defined loci in cattle *Science* 201:159 (1978)
- Van Leeuwen F.W., Pool C.W. & Shutter A.A.: Enkephalin immunoreactivity in synaptoid elements on glial cells in the neural lobe *Neuroscience* 8:229 (1983)
- Wang B., Biron C., She J., Higgins K., Sunshine M.-J., Lacy E., Lonberg N. & Terhorst C.: A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human CD3 ϵ gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 91: 9402 (1994)
- Wiest D.L., Burgess W.H., McKean D., Kearse K.P. & Singer A.: The molecular chaperone calnexin is expressed on the surface of immature thymocytes in association with clonotype-independent CD3 complexes *EMBO J.* 14:3425 (1995)

Wijngaard P.L.J., Metzelaar M.J., MacHugh N.D., Morrison I.W. & Clevers H.C.: Molecular characterization of the WC1 antigen expressed specifically in bovine CD4-CD8+ $\gamma\delta$ lymphocytes *J.Immunol.* 149:3273 (1992)

Wong R.C.K., Remold O'Donell E., Vercelli D., Sancho J., Terhorst C., Rosen F., Geha R. & Chatila T.: Signal transduction via leukocyte antigen CD43 (sialophorin) *J.Immunol.* 144:1455 (1990)

Zuckermann F.A., Binns R.M., Hausmann R., Yang H., Carr M.M., Kim K.B., Davis W.C., Misfeldt M. & Lunney J.K.: Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD44 and CD45 *Vet.Immunol.Immunopathol.* 43:293 (1994)