

A bursa szekréciós dendritikus sejtek karakterizálása új monoklonális ellenanyagokkal

Dolgozat

XXVII. Erdélyi Tudományos Diákköri Konferencia Reál és
Humántudományok
Biológia és Környezettudomány szekció

Szerző:

BOGYA STEFÁNIA – ZSÓFIA

Témavezető:

Prof. Dr. Nagy Nándor
Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

BABEŞ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM

Kolozsvár, 2024

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Bevezetés	3
Irodalmi áttekintés.....	4
1. A bursa Fabricii felfedezésének rövid története	4
2. A bursa Fabricii makroszkópos felépítése és fejlődése	5
3. A bursa follikulusok szövettani szerkezete.....	7
Célkitűzések.....	10
Anyagok és módszerek	11
1. Kísérleti állatok.....	11
2. Minták szövettani előkészítése és feldolgozása	11
2.1. Fagyasztott zselatinos blokk készítése.....	11
2.2. Zselatinos fagyasztott blokk metszése	11
3. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia	12
3.1. Immunhisztokémia.....	12
3.2. Egyszeres immunfluoreszcens festés	13
3.3. Kettős immunfluoreszcens festés.....	13
4. Felhasznált ellenanyagok	14
Eredmények.....	16
1. A bursa lymphoid sejtek immunfenotípusa	16
2. A lymphoid follikulusok struktúrális alapváza	18
3. A bursa Fabricii myeloid sejtjei	19
4. A bursa Fabricii morfológiája és sejtjes összetétele az embriónális fejlődés 14. napján....	22
Következtetések.....	23
Összefoglaló	24
Hivatkozások	25

Bevezetés

A gerinces állatokkal foglalkozó immunológiai, fejlődésbiológiai és neurobiológiai alap kutatások egyik fontos modellállata a házityúk és a csirke embrió. A madarak immunrendszerének kísérletes tanulmányozása felbecsülhetetlen értékű lehetőséget jelentett az alapvető immunológiai vizsgálatokhoz, így számos immunrendszer embrionális fejlődésére és működésére vonatkozó felfedezést is először a csirkékben végeztek el. Csirke embriókban azonosították például az első vérképző őssejteket. A transzplantált szervek kilökésének háttérben zajló graft-versus-host válaszokat és a limfociták szerepét az adaptív immunitásban szintén csirkék segítségével írták le először. Továbbá, a madarakra jellemző bursa Fabricii szolgáltatta az első fontos bizonyítékot arra, hogy a bursában fejlődő limfociták (B-sejtek) ellenanyagokat termelnek. A bursa Fabricii a humorális immunválasz kialakításában szerepet játszó primer nyirokszerv, ahol a B sejtek érését a támasztó funkcióval rendelkező hámsejtek és az antigénprezentáló dendritikus sejtek mikrokörnyezete biztosítja. A B-limfocitákkal ellentétben, a stromális mikrokörnyezetet létrehozó sejtek molekuláris tulajdonságai csak részben ismertek. Alap kutatás mellett gyakorlati haszna is nagy a háziiasított madaraknak, hiszen a baromfitenyésztés és a tojástermelés népelelmezési szempontból kiemelt fontossággal bír.

Az előrehaladott alap és alkalmazott kutatások ellenére, a baromfiipar számára napjainkban továbbra is komoly gondot jelentenek azok a vírusos megbetegedések, amiket a madárinfluenza, Newcastle vírus vagy a fertőző bursitis (gumboro betegség) vírus okoz. A vírusfertőzések súlyos immunszuppressziót váltanak ki a csirkékben, a magas mortalitással kísért betegségek pedig komoly gazdasági kárt okoznak a tenyésztőknek. Nem csupán a madarakra jelent veszélyt, az emberekben is jelentkezhet, akár halálos kimenetelű fertőzés, ami fertőzött madaraktól kerülhet át emberbe a nem megfelelően hőkezelt húsból. Habár kísérletesen bizonyított, hogy a vírustörzsek elsősorban a madarak primer és szekunder nyirokszerveit, kiemelten a bursa Fabriciit támadják meg, az adaptív immunrendszert károsítják, a vírusok elsődleges célsejtje, a betegség korai patomechanizmusa nem ismert. Feltételezik, hogy a bursa dendritikus sejtek kulcsszerepet töltenek be a vírusfertőzések lefolyásában, ezért molekuláris karakterizálásuk elengedhetetlenül szükséges a sejtek immunfunkciójának megértéséhez.

Irodalmi áttekintés

1. A bursa Fabricii felfedezésének rövid története

A bursa Fabricii madarakra jellemző primer nyirokszerv, mely a nevét felfedezőjéről, Hieronymus Fabricius-ról kapta. Girolamo Fabrici d'Acquapendente néven is ismert Hieronymus Fabricius 1533 – 1619 között élt Padovában, Olaszországban, ahol az egyetemen professzorként anatómiát és sebészetet oktatott. 1621-ben jelent meg részletes anatómiai és fejlődéstani monográfiája, melynek címe „*De Formatione Ovi et Pulli*”. Ebben a műben olvasható először a leírás arról a szervről, amit róla neveztek később el, amelyre úgy hivatkozik, mint a madarakra jellemző, kloáka üregével kapcsolatban álló zsákszerű szerv (Ribatti és mtsai., 2020). A működésével kapcsolatban, Hieronymus Fabricius úgy hitte, hogy a spermium tárolására szolgál ez a szerv, és csak jóval később, a 20. században derült fény a bursa Fabricii tényleges funkciójára. Az 1950-es években egy immunológiai laborgyakorlaton végzett kísérlet során *Salmonella* spp. O antigén elleni ellenanyag termeltetésére Bruce Glick állatorvos bursectomizált madarakat használt fel. Azok a madarak, amelyeknél korábban a bursa sebészi úton el lett távolítva, nem voltak képesek antigén-specifikus ellenanyagot termelni (Glick, 1956; Ribatti és mtsai., 2006). A felfedezés hatására egyre több olyan kísérlet született, melyet a bursa Fabricii-n végeztek. Így Cooper és munkatársai Glick korábbi megfigyelése nyomán a bursa mellett, kísérletüket kiterjesztették más lymphoid szervekre, és ennek kapcsán elkezdék tanulmányozni a tímusz működését is. Kísérleteik során figyelembe vették mind a tímusz mind a bursa működését egyaránt, különböző kísérletes csoportokba sorolva a madarakat. Eredmények kiértékelése azt mutatta, hogy a bursa által termelt B-limfociták az ellenanyag által közvetített, humorális immunválasz komponensei, míg a tímusz T-limfocitái a sejtes immunitást biztosítják, és ezek együttes működése teszi lehetővé az adaptív immunválasz kialakítását (Cooper és mtsai., 1965).

Később azonosítottak emlősökben is úgynevezett bursával megegyezést mutató szerveket, amelyek képesek a B-limfociták érését és differenciálódását elősegítő speciális mikrokörnyezet kialakítására. Ilyen például a kérődzőkben az ileális Peyer-plakkok (Reynaud és mtsai., 1991), nyúlban az appendix (Pospisil és Mage, 2011), illetve emberben és más emlősökben a csontvelő (Abdou és Abdou, 1972).

2. A bursa Fabricii makroszkópos felépítése és fejlődése

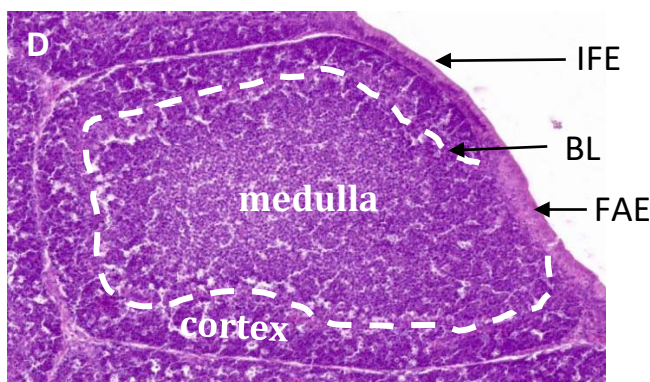
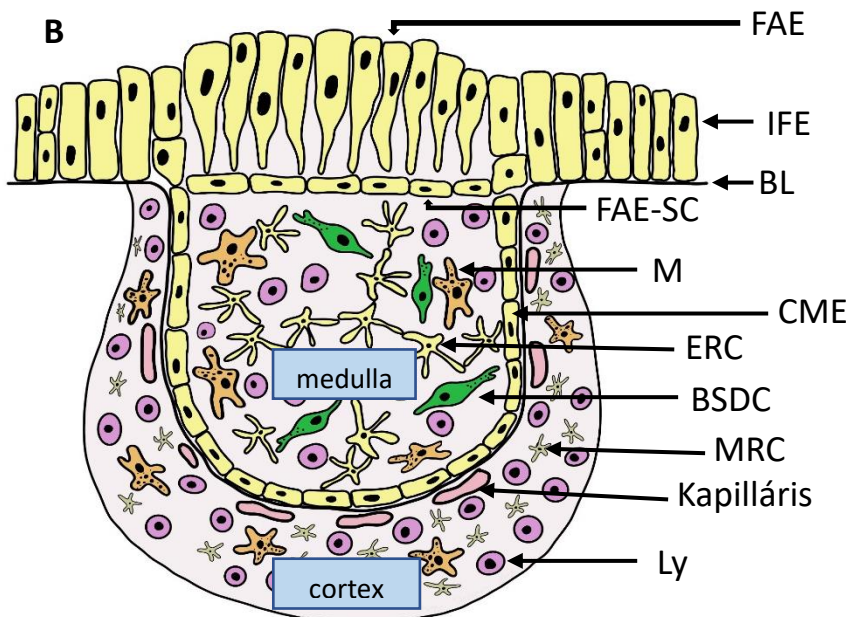
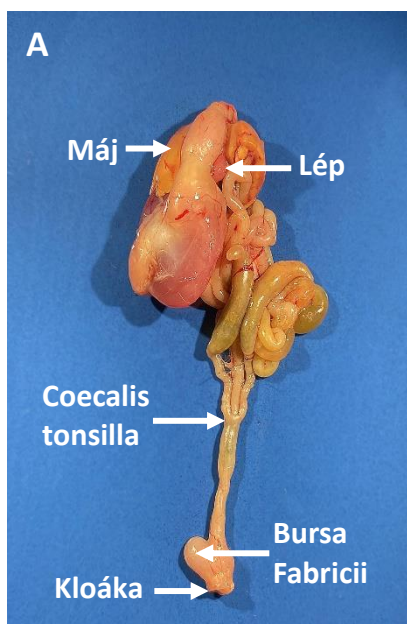
Felnőtt csirkében a bursa Fabricii 1,6-1,8 cm átmérőjű, gesztenye nagyságú üreges szerv, a keresztcsont és a vastagbél között helyezkedik el, lumene a kloáka proktodeum üregével kommunikál (1A. ábra). A bursa ektodermális eredetű, kívül egy kötőszövetes tok borítja, ez alatt pedig nagyon vékony izomréteg húzódik (Nagy és Oláh, 2010). Belső felszínét hosszanti irányba 10-12 redő tölti ki (1C. ábra). A redők a bursa szerkezeti és működési alapegységének nevezett folliculusokból épülnek fel, saját vér ellátással rendelkeznek, melyet a redők hosszanti tengelyében húzódó artériák és nyirokerek biztosítanak.

A folliculusok száma redőnként közel 1000-re tehető, így összesen a bursában körülbelül 12.000 folliculus található (Nagy és Oláh, 2010). A folliculusok szerkezetileg két jól elkülöníthető részre oszthatók: egy külső mezodermális eredetű kéregállományra (cortex) és egy belső ektodermális eredetű velőállományra (medulla) (1D. ábra). A kéreg-velő határon bazális membrán húzódik, amely elkülöníti a folliculáris kompartmentumokat egymástól. A medulla nem vaszkularizált, ellenben a cortex-el, melyet sűrű hajszálérhálózat vesz körül a kortiko-medulláris alaphártya alatt. A velőállomány tipikus limfo-epiteliális szövetnek tekinthető, struktúrális vázát az ektodermális eredetű hámretikulum (ERC) képezi (Nagy és Oláh, 2010), amelyet szekréciós dendritikus sejtek, makrofágok és B-limfociták töltenek ki (1B. ábra). A hámretikulum sejtek nyúlványos, csillag alakú sejtek, melyek egy térhálós szerkezetet hoznak létre a bursa velőállományában. A kéreg-velő határhoz közeledve ezek a csillag alakú sejtek egyre inkább ellaposodnak és az úgynevezett kortiko-medulláris hámot hozzák létre (CME). A cortex alapállományát mesenchymális eredetű retikulum képezi (MRC), mely fibronectinben és kollagénben gazdag extracelluláris mátrixot termel (ECM), lazább háromdimenziós hálózatot hozva létre, mint a velőállományban jelen levő hámretikulum (Oláh és Glick 1995; Nagy és mtsai., 2004; Madej és mtsai., 2013; Nagy N., Oláh I., Vervelde L., (2022). *Avian Immunology*, p.11-44).

A redőket hámréteg borítja, legnagyobb részt, hengerhám típusú interfollikuláris epitélium (IFE) borítja, és csupán 10%-át határolja az úgynevezett folliculus-asszociált hám (FAE) (Oláh és Nagy, 2013). Különlegessége a folliculus-asszociált epitéliumnak, hogy a folliculus apikális részén elhelyezkedő sejtcsoportulások alatt, nem található bazális membrán, helyette úgynevezett FAE-támasztó hám (FAE-SC) választja el a lument a medulla B-limfocitáitól. A FAE direkt

kapcsolatot teremt a bursa lumene és a follikulus velőállománya között, kétirányú anyagszállítást téve lehetővé.

A bursa Fabricii megjelenése az embrionális fejlődés 4-5. napján kezdődik. Az 5. napon epiteliális telep formájában kezd el fejlődni, a proctodeum falának megnagyobbodásából, majd hámcsap formájában benő a farokbimbó mesenchymájába. Az elkövetkező napokban intenzív vakuloizáció veszi kezdetét, és így kialakul a bursa lumene. Az embrionális fejlődés 10-15. napjain CD45+ vérképző őssejtek kolonizálják a bursa mesenchymális telepét és a follikulus kezdeményeket. Minden follikulus kezdeményt 3-4 B-limfocita prekursor népesíti be, ami létrehozza a follikulus teljes B-limfocita populációját. Kikeléskor a kéregállomány még nem alakult ki, a kikelést követően néhány nappal kezdődik el csak a fejlődése (Oláh és mtsai., 1986). Ivarérett korban a bursa Fabricii fokozatosan visszafejlődik. Három hónapos kor után a bursa teljes involúciója figyelhető meg, cortex és medulla sejtes állománya és az extracelluláris állomány visszafejlődik (Ciriaco és mtsai., 2003).



1.ábra. A bursa Fabricii szerkezete és elhelyezkedése. (A) Kiboncolt 5 napos csirke zsigeri komplexuma. A bursa Fabricii a rectum disztális részén, a kloákához asszociáltan helyezkedik el. **(B)** A bursa folliculus sémás szöveti szerkezete. FAE: folliculus-asszociált epitélium, IFE: interfollikuláris epitélium, FAE-SC: folliculus-asszociált epitélium támasztó sejt, BSDC: bursai szekréciós dendritikus sejt, ERC: hámretikulum sejt, M: makrofág, BL: bazális membrán, CME: kortiko-medulláris hám, Ly: limfocita, MRC: mesenchymális retikuláris sejt. **(C)** 5 hetes csirke bursa Fabricii hossz tengelye mentén szétnyitva; jól megfigyelhető a redők elhelyezkedése. **(D)** Bursa Fabricii folliculusának szövettani szerkezete: paraffinos metszet, hematoxilin-eozin festéssel. FAE: folliculus-asszociált epitélium, IFE: interfollikuláris epitélium, BL: bazális membrán. **(Saját preparálás és metszet)**

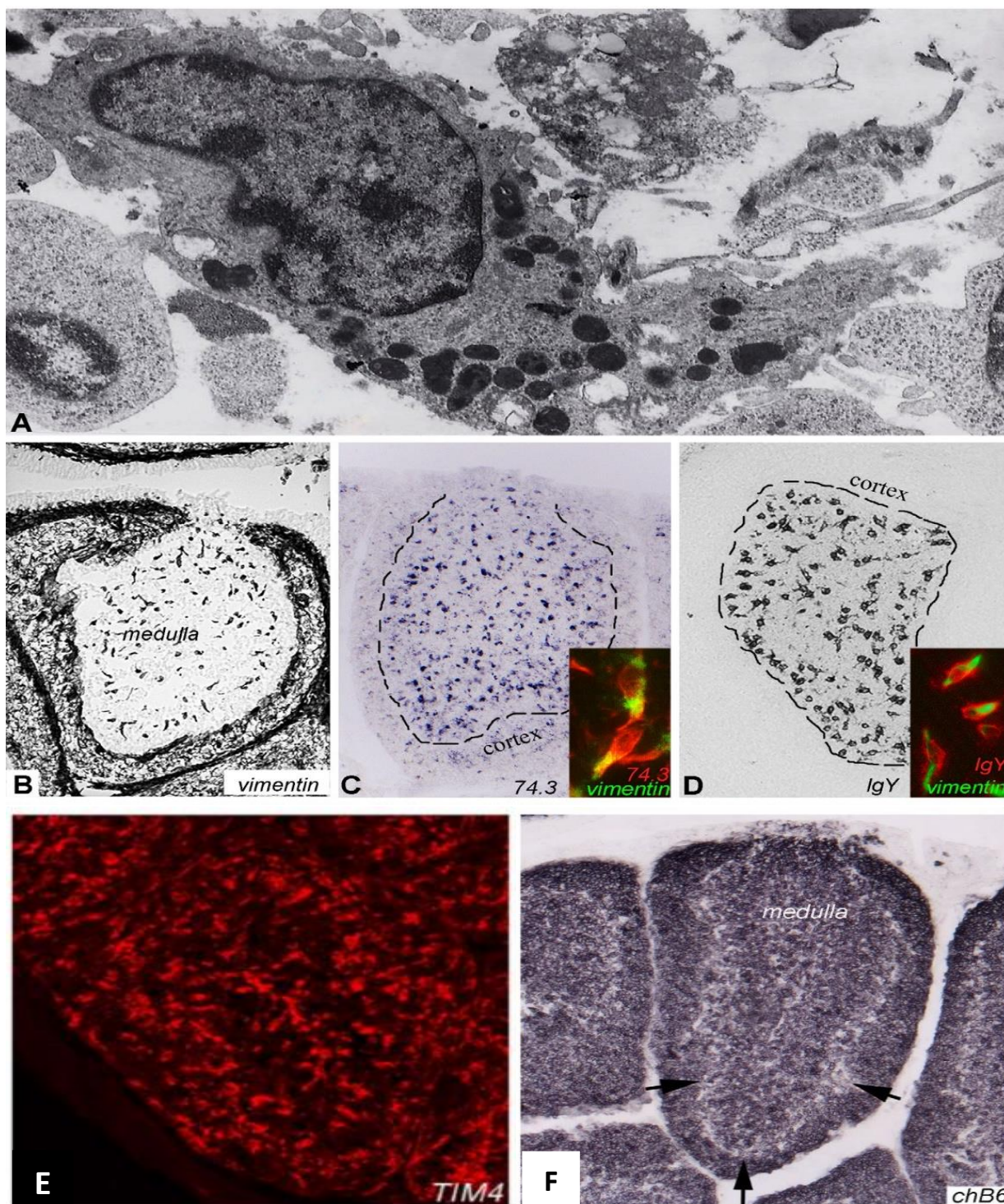
3. A bursa folliculusok szövettani szerkezete

A bursa Fabricii folliculusa jól elkülöníthető kéreg- és velőállományra osztható. A velőállomány szöveti felépítésében négy specifikus sejt vesz részt: szekréciós dendritikus sejtek (BSDC), B-limfociták, makrofágok és retikuláris hámsejtek. A kéregállomány alkotásában mesenchymális hámretikulum, B-limfociták (ellentétben a medulláris B-limfocitákkal: kisebbek, sűrűbben helyezkednek el és gyorsabban osztódnak (Nagy és mtsai., 2004)), makrofágok és elszórta néhány dendritikus sejt vesz részt.

A medulla térhálós szerkezetét biztosító **retikuláris hámsejtek** cytokeratin+/E-cadherin+ kettős immunpozitivitás jellemzi, míg a cortexben előforduló **mesenchymális retikuláris sejtek** vimentin+/dezmin+ intermediér filamentumokat fejeznek ki. A velőállomány **B-limfocitái** elektronmikroszkópos felvételek alapján, kerekded alakúak, illetve sötétre festődő, heterokromatikus sejtmaggal rendelkeznek. Bu-1 (chB6) antigént fejeznek ki (2H. ábra), csak úgy mint a kéregben előforduló limfociták, viszont cortexben jelen levő chB6+ sejtek LT2 antigénre pozitívak, nem úgy mint a medulla limfocitái (Paramithiotis és Ratcliffe, 1994; Ratcliffe és Härtle, 2022). IgM expresszió csak a velőben figyelhető meg (Oláh és mtsai., 1992). Kikelés után a CXCR4 receptor csak a kéregállomány B-limfocitáinak felszínén jellemző receptor (Nagy és mtsai., 2020). A bursa folliculusban Lep100+/TIM4+ **makrofágok** vannak jelen, melyek mind a velőállományban, mind a kéregállományban nagyjából egyenlő számban, egyenletesen elszórva fordulnak elő (2E. ábra) (Balic és mtsai., 2019; Lippincott-Schwartz és Fambrough, 1987).

A **szekréciós dendritikus sejtek (BSDC)** a bursa folliculus velőállomány jellegzetes sejt típusa. 1978-ban fedezték fel; Oláh Imre és Bruce Glick írták le először csirkében (Olah és

Glick, 1978). Morfológiailag egy nyúlványos sejtről beszélünk, melynek sejtmagja elektronmikroszkópos felvételen a B-limfocitákra is jellemző kerékkülőhöz hasonló heterokromatikus szerkezetet mutat (2A. ábra). Általában két asszimetrikus nyúlvánnyal rendelkeznek, melyekben a sejtservecskék eloszlása nem egyenletes, így jellegzetes polarizáltságot kölcsönözve a sejtnak. Az egyik nyúlványban jellegzetesen több citoplazmatikus granulum figyelhető meg; itt a durva endoplazmatikus retikulum és a Golgi-készülék is egyaránt fejlettebb. A másik nyúlvány nem tartalmaz szekréciós granulumokat, citoplazmatikus organellekben szegény, más dendritikus sejtekhez és a bőr Langerhans sejtjeihez hasonlóan, vimentin intermedier filamentum tölti ki (Oláh és Glick, 1978; Nagy és mtsai., 2016). A bursa dendritikus sejtjei szekréciós tevékenységet folytatnak, innen kapták nevüket is, és ezáltal hozzájárulnak a follikulusok specifikus mikrokörnyezetének kialakításához és a B-limfociták differenciálódásához. Antigén prezentáló sejtek (APC) lévén szerepük van a B-limfociták érésében (Oláh és mtsai., 1986). A dendritikus sejtek CD45+ vérképző őssejt eredetű, úgynevezett „sötét sejtekből” differenciálódnak és vimentin mellett az ismeretlen molekuláris tulajdonságú citoplazmatikus 74.3 antigént fejeznek ki (Nagy és mtsai., 2004). A 74.3 előnye, hogy embrióban és felnőtt állatban egyaránt jelöl, viszont intracitoplazmatikus, gyenge immunreaktív jelt ad immuncitokémiával, nagyon érzékeny a szövet fixálás módjára. Későbbi kutatások szerint felvetődött az az elképzelés, hogy a kolónia stimuláló faktor 1 receptort (CSF1R) jelölő ellenanyag, emlősekhöz hasonlóan, a makrofágok mellett, a dendritikus sejteket is jelöli (Balic és mtsai., 2019). Felnőtt madarakban a szekréciós dendritikus sejtek IgG-t expresszálnak, viszont embrionális korban nem működik, sőt nem a sejtek termelik, csupán sejtfelszínen kikötött IgG. Az IgG elnevezést később IgY-ra módosították, mert a nehézlánc molekuláris szerkezete eltérést mutat az emlős IgG molekula ezen részétől (Felföldi és mtsai., 2005). A vimentin egy jó támpontot biztosít a B-limfocitáktól és a cytokeratin+ retikuláris hámsejtektől való megkülönböztetésben, viszont nem specifikusan jelöl, hiszen a kéregben levő retikulumsejtek is kifejezik. Továbbá, intraspecifikus jelölést mutat, ami nem teszi alkalmassá sejtizolációs kísérletekre. Ugyanez a technikai nehézség jellemzi a 74.3 ellenanyagot is. Mivel a citoplazmatikus antigének és a nemspecifikus jelölésű antigének nem alkalmasak a BSDC szelektív izolálására, a bursa dendritikus sejtek funkcióját in vivo és in vitro nehezen lehetett vizsgálni.



2. ábra. A bursa Fabricii jellegzetes sejtípusai. (A) Elektronmikroszkópos felvétel a bursa szekréciós dendritikus sejtről. (B) Vimentin jelölés amely kirajzolja a velőállomány dendritikus sejtjeit és a kéregállományban levő mesenchymális retikulum sejtjeit. (C) Vimentinhez hasonló jelölést mutat szintén a velőállományban a 74.3 marker is. (D) Szekréciós dendritikus sejtek felszínükön megkötik az IgY-t (Oláh és Nagy, 2013) . (E) Makrofágok TIM4 expressziója a limfoid follikulusok kéreg- és velőállományában egyenletes eloszlásban jelöl (Avian Immunology, 2022) . (F) chB6 specifikus ellenanyag a kéreg- és velőállomány B-limfocitáit jelöli.

Célkitűzések

- A felnőtt csirke bursa Fabricii follikulusokat alkotó lymphoid és myeloid sejtek karakterizálása immuncitokémiai módszerekkel.
- A bursa szekréciós dendritikus sejtek jellemzése sejt membránfehérjéket felismerő új monoklonális ellenanyagokkal.

Anyagok és módszerek

1. Kísérleti állatok

Kísérletek során White Leghorn típusú, SPF (Specific-pathogen-free) csirke embriókat és felnőtt állatokat használtam. A csirke tojásokat kereskedelmi tenyésztőktől (Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt.) szereztük be, majd 37,7 °C-on inkubáltuk a laboratórium keltetőgépeiben (HekaBrutgerate, TS-7000C). A kikelt állatok a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetének madárházában voltak elhelyezve.

2. Minták szövettani előkészítése és feldolgozása

2.1. Fagyasztott zselatinos blokk készítése

A bursa Fabricii felnőtt állatból (3-6 hetes), vagy embrióból (14, 16, 18 napos embrió) történő kipreparálás után, a szervet 4%-os paraformaldehid oldatba fixáltam 1 órán keresztül. Ezt követően 3x5 percet foszfát pufferolt sóoldatba (PBS) mostam, majd a PBS mosás után, éjszakára, 4 °C-on, 15%-os szacharóz oldatba tároltam. Az inkubálást követő másik nap a szacharózt 7,5%-os zselatinra cseréltem, majd további 2 órát inkubáltam 37 °C-on. A beágyazás során a felmelegített 7,5%-os zselatint egy műanyag kiöntő tálka aljára töltöttem, majd ráhelyeztem a bursa Fabricii darabot, orientáltam, miután megszilárdult a zselatin, egészen felöntöttem a tálkát. Miután ez is teljesen megszilárdult, a zselatinos szövetblokkot 1x1 cm-s kockára vágtam és egy előre feliratozott karton darabra helyeztem. Ezt követte a blokk lefagyasztása, amely -60 °C-os izopentánba történt (ezt előre lehűtöttem folyékony nitrogén segítségével a megfelelő hőmérsékletre). A fagyasztás 1 percet tart, az így elkészült blokk azonnal metszhető, felhasználásig -80 °C-on tárolandó.

2.2. Zselatinos fagyasztott blokk metszése

A szövettani metszetek elkészítéséhez Shandon típusu kriótómot használtam. A metszéshez előkészítve a blokkot leválasztottam a karton darabról és a kriótóm metszettartójára rögzítettem Shandon Cryomatrix segítségével. A metszés -28 °C-on történik, a 12 µm vastagságú metszeteket

pedig poli-L-lysine-nel bevont tárgylemezre vettem fel. Az így elkészült metszeteket mélyhűtőben, -20 °C-on tároltam felhasználásig.

3. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia

3.1. Immunhisztokémia

A laborban általánosan használt protokollnak megfelelően, a kiválasztott fagyasztott zselatinos metszeteket előre felmelegített PBS-be rehidráltam 10 percet, amely elegendő a zselatin kioldódásához. A rehidrált metszeteket körbetörölgettem egy papírvattával, hogy megakadályozzam a következő lépésben felkerülő ellenanyagok összefolyását. Az ellenanyagok összefolyásának elkerülése érdekében a metszeteket ajánlott körbe karcolni. A primer ellenanyagok hígítása 1%-os BSA-t tartalmazó PBS-ben (PBS-BSA) történik. A metszetek nagyságától függően, körülbelül 35-90 µm primer ellenanyagot mértem. A metszeteket, rajtuk a primer ellenanyaggal nedves kamrába helyeztem és szobahőmérsékleten inkubáltam 1 órát (1.táblázat). Az inkubálást 3x5 perc PBS mosás követi. A következő lépésben rámértem a metszetekre a primer ellenanyagnak megfelelő izotípusú és állatfajú szekunder ellenanyagot. A szekunder ellenanyagot, a primérhez hasonlóan PBS-BSA-ban hígítottam 1:200 arányban, majd nedves kamrában inkubáltam 45 percet. Az inkubációs idő lejártá után 3x5 perc PBS mosás. Ezután következik a szöveti endogén peroxidáz blokkolás, a tárgylemezeket 30%-os H₂O₂ (Molar Chemicals, 03650-101-340) oldatot tartalmazó küvettába helyeztem 10 percre. Ezt követően a metszeteket 3x5 percet PBS-ben mostam, majd az avidin-biotin peroxidáz komplexet összeállítottam, 1:100 arányban PBS-ben hígítva, az összeállítás után fél órával rámértem a metszetekre, majd 30 percet inkubáltam nedves kamrában szobahőmérsékleten. Ezzel egyidejűleg összeállítottam a kloronaftol törzsoldatot: 50 ml PBS-hez 50 µm kloronaftol törzsoldatot adtam, majd ezt sötétben, mágneses keverőn kevertettem 30 percet. Az oldatot felhasználás előtt szűrőpapíron átszűrtem és 250 µm 3%-os H₂O₂ (Sigma, 88597-100ML-F) oldatot mértem hozzá. Az avidin-biotin komplexel történő inkubációs idő lejártá után 3x5 percet mostam PBS-ben. Az előhívás a kloronaftolos oldatban, 30 percen át, sötétben történt. Ez idő alatt a peroxidáz enzim lila csapadékot képez az ellenanyag kötődésének helyén. Végül 3x5 perc PBS mosás után vízzoldékony lefedővel (Mowiol, Sigma, 81381-250G) lefedtem a metszeteket, ezt követően 4 °C-on tároltam.

3.2. Egyszeres immunfluoreszcens festés

Ez az eljárás a fent leírtakhoz hasonlóan, a metszetek rehidráálásával kezdődik, 10 percre meleg PBS-ben. Ezt követte a primer ellenanyag, amit 1 órát inkubáltam nedves kamrában szobahőmérsékleten. Újabb 3x5 perc PBS mosás következett. Ezután pedig a primer ellenanyagoknak megfelelő izotípusú fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyag, 45 percet inkubáltam. Ezt 3x5 percet mostam PBS-ben. A sejtmagokat DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride) reagenssel hívtam elő (10 perc inkubáció sötétben). Utolsó lépéseként 3x5 perc PBS mosás következett, végezetül pedig a metszeteket vízőldékony lefedővel (Mowiol) fedtem le és felhasználásig 4 °C-on tároltam.

3.3. Kettős immunfluoreszcens festés

Különböző molekulák expressziójának összehasonlítása céljából kettős immunfluoreszcens festéseket alkalmaztam. Az immuncitokémiai festés alapja, hogy két különböző izotípusú és/vagy állatfajú primer ellenanyagot használtam és a primer ellenanyagoknak megfelelő izotípusú és állatfajú, fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyaggal hívtam elő (2.táblázat). Akárcsak az immunhisztokémiai festésnél, itt is első lépésben a kiválasztott metszeteket előre felmelegített PBS-ben rehidráltam 10 percet. A rehidráálás után rámértem a metszetek méretének megfelelő mennyiségű primer ellenanyagot melyet 1 órát inkubáltam szobahőmérsékleten, nedves kamrában. A primer ellenanyagot PBS-BSA-ban hígítottam. Az inkubációs idő eltelte után a metszeteket 3x5 percet mostam PBS-ben, majd rámértem a primernek megfelelő állatfajú és izotípusú fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyagot, amit 1:200 arányban hígítottam PBS-ben. Így inkubáltam 45 percet szobahőmérsékleten, nedves kamrában. Következő lépésként 3x5 perc PBS mosás következett, ezután pedig a második primer ellenanyag került fel a metszetekre amelyet szintén 1 órát inkubáltam szobahőmérsékleten, nedves kamrába. Ezt követte 3x5 perc PBS mosás, majd a felkerült második szekunder ellenanyagnál figyeltem arra, hogy a második primernek megfelelő izotípusú és állatfajú legyen, illetve eltérjen az első szekundertől. Az inkubációs idő szintén 45 perc, amit 3x5 perc PBS mosás követett. A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride) reagenst használtam, amit 10 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, nedves kamrában. Utolsó lépésben pedig 3x5 percet mostam PBS-ben és vízőldékony lefedővel (Mowiol) fedtem le a metszeteket.

4. Felhasznált ellenanyagok

1.táblázat. Felhasznált primer ellenanyagok listája

Primer ellenanyagok	Klón neve	Hígítás	Cég/Származás	Izotípus
CD45	Hisc7	1:200	Pronics	egér IgG _{2A}
chB6	BoA1	felülúszó	laborban	egér IgG ₁
chBAFF-R	2C4	1:200	Dr. Sonja Hartle, München University	egér IgG ₁
M2	-	1:200	Dr. Sonja Hartle, München University	egér IgG _{2a}
CSF1R	ROS-AV170-MCA5956GA	1:80	BioRad	egér IgG ₁
TIM4	ROS-JH9	1:1000	BioRad	egér IgG ₁
74.3	CVI-ChNL-74.3	felülúszó	Prionics	egér IgG ₁
MHCII	-	1:200	DSHB	egér IgG ₁
E-cadherin	36	1:200	BD Biosciences	egér IgG _{2A}
anti-cytokeratin	Lu-5	1:200	Sigma	egér IgG ₁
P75	-	1:200	Dr Louis Reichardt, San Francisco, Caltech	nyúl IgG ₁
10C12	-	1:200	Dr. Sonja Hartle, München University	egér IgG ₁
8F2	CD11d	1:200	Dr. Sonja Hartle, München University	egér IgG ₁
Lep100, Lamp-1 lizoszomális membránfehérjét jelöl	5G10	1:200	DSHB	egér IgG ₁
alfaVbeta3 integrin	LM609	1:200	Sigma	egér IgG ₁
7D6	-	1:200	DSHB	egér IgG ₁
Neuropilin-1	TB2	1:200	DSHB	egér IgG ₁

2.táblázat. Felhasznált szekunder ellenanyagok listája

Szekunder ellenanyag	Cég/Származás	Katalógusszám
ALEXA-488-konjugált anti egér IgG ₁	Invitrogen	A21121
ALEXA-488-konjugált anti egér IgG _{2A}	Invitrogen	A21131
ALEXA-488-konjugált anti egér IgG	Invitrogen	A21202
ALEXA-594-konjugált anti egér IgG	Invitrogen	A11005
ALEXA-594-konjugált anti egér IgG ₁	Invitrogen	A21125
ALEXA-594-konjugált anti egér IgG _{2A}	Invitrogen	A21135
ALEXA-594-konjugált anti nyúl IgG	Invitrogen	A21206
ALEXA-488-konjugált anti nyúl IgG	Invitrogen	A11037
biotinilált anti-egér IgG (H+L)	Vector	BA-9200
biotinilált anti-nyúl IgG (H+L)	Vector	BA-1000

Eredmények

A kísérletem során felhasznált monoklonális ellenanyagok segítségével jellemeztem a bursa Fabricii alkotásában részt vevő jellegzetes sejttípusokat, melyek a következők: B-limfociták, szekréciós dendritikus sejtek, makrofágok, retikuláris hámsejtek és retikulum sejtek. Ahhoz, hogy a bursa szekréciós dendritikus sejteinek karakterizálását elvégezzem, szükség volt a lymphoid follikulus teljes szerkezetének tanulmányozására.

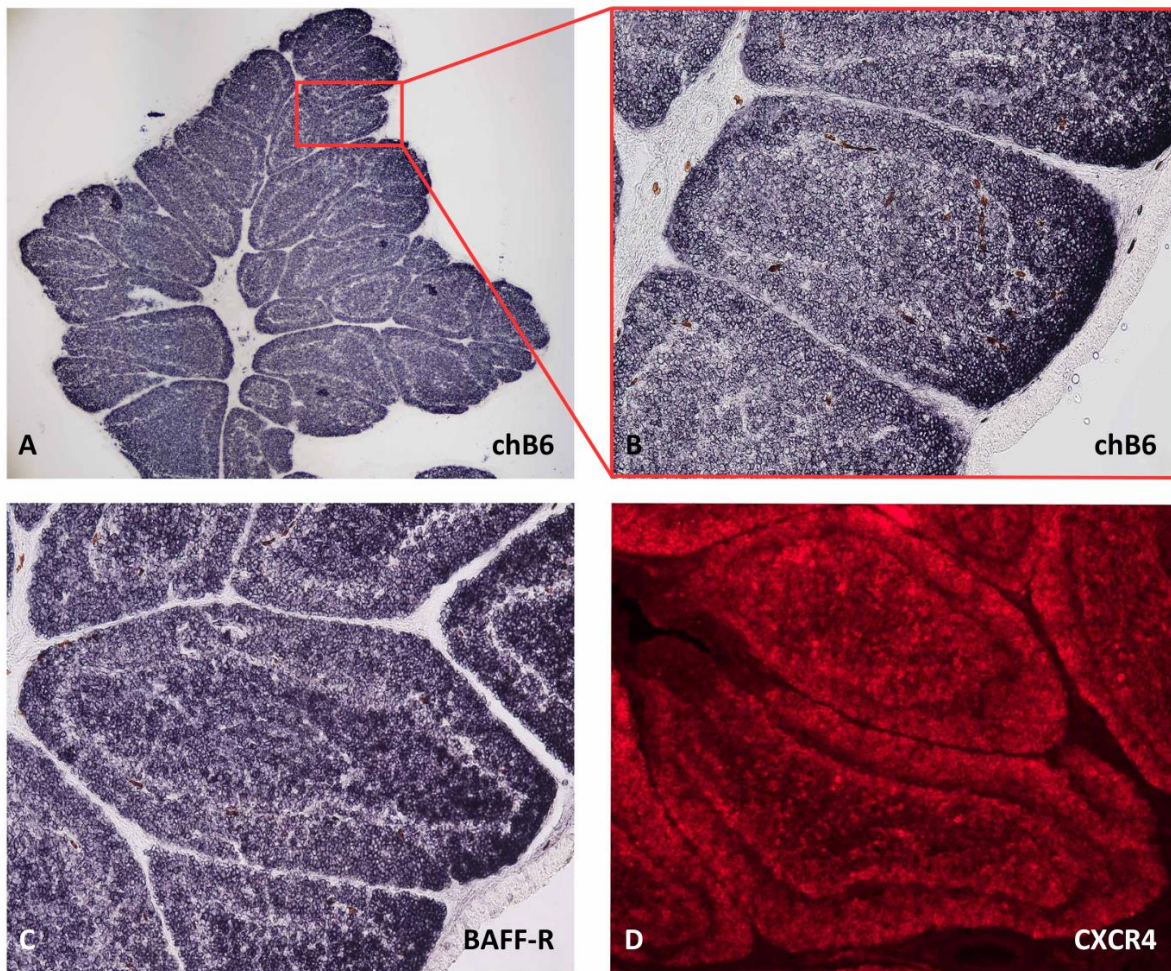
1. A bursa lymphoid sejtek immunfenotípusa

A bursa Fabricii lymphoid sejttípusának 98%-a B-limfocita melyek embrionális korban kolonizálják a follikulus bimbót, az aorta vérképző helyeiről érkezve, és csupán néhány T-sejt található elszórtan a kéregállományban. A fejlődő bursában az embrionális fejlődés 13. napjára már a redők kitöltik a szerv lumenét, ezekben pedig a follikulus bimbók készen állnak a B-limfocita prekurzorok fogadására (Nagy és mtsai., 2016).

Felnőtt állatban a B-limfociták mind a kéreg-, mind a velőállományban egyformán, egyenlő arányban fordulnak elő. (Nagy N., Oláh I., Vervelde L., (2022). Avian Immunology, p. 21).

Korábbi kísérletek igazolták, hogy a bursa follikulusban két elkülönülő B-limfocita populáció figyelhető meg. Az egyik a chB6⁺ B-limfociták, melyek egyenlően oszlanak el a kéreg és a velőállományban egyaránt, valamint ezen belül a chB6/CXCR4⁺ sejtek különülnek el. Az utóbbiak a lymphoid follikulus kéregállományában figyelhetőek meg, és a velőállományban, kizárólag a kéreg-velő határ mentén lokalizálódnak (Nagy és mtsai., 2020).

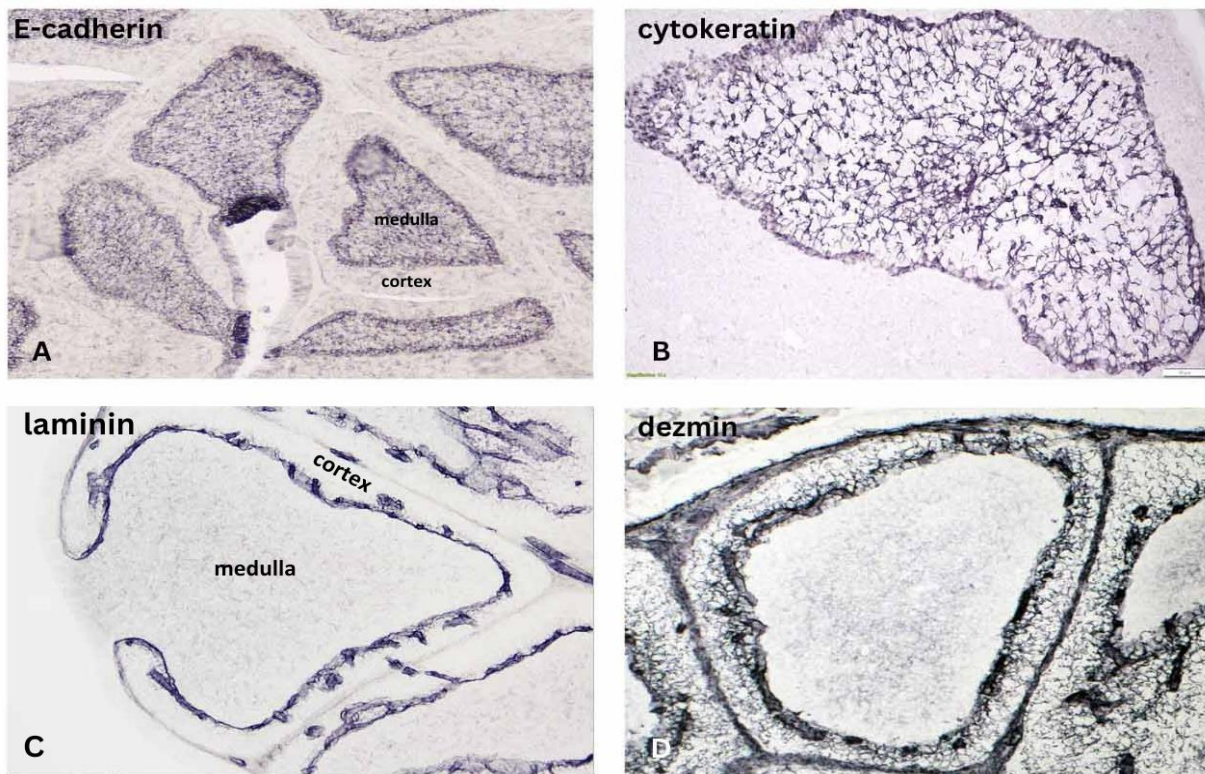
Kísérletes munkám első lépésben a lymphoid sejtek immuncitokémiai jelölését végeztem el. B-limfociták megfigyelésére immuncitokémiai festést alkalmaztam ahol a chB6, BAFF-R molekulára specifikus monoklonális ellenanyagokat használtam illetve immunfluoreszcensen vizsgáltam a CXCR4 molekula kifejeződését. Az ellenanyagok membránjelölést mutatnak a B-limfociták feliszínén. A chB6⁺ sejtek kitöltik a redőket (3A. ábra), a follikulusok kéreg- és velőállományát (3B. ábra). Ehhez hasonló a BAFF-R immunreakció (3C. ábra). A CXCR4 intenzíven jelöli a kérgi sejteket (3D. ábra).



3.ábra. A bursa Fabricii limfoid sejtjei: B-limfociták. (A) A bursa Fabricii egy teljes redője, chB6 immunhisztokémiai jelöléssel. **(B)** Limfoid follikulus kinagyítva, chB6⁺ sejtek egyenlően oszlanak el a kéreg- és a velőállományban egyaránt. **(C)** A B-limfociták felszínén expresszálódik a BAFF-receptor. **(D)** Egyszeres immunfluoreszcens festés, CXCR4 receptor kifejeződése B-limfocitákon.

2. A lymphoid folliculusok struktúrális alapváza

A bursa lymphoid folliculusai sajátos struktúrális szerkezettel rendelkeznek; hisztológiai kép alapján felosztható egy külső kéregállományra (cortex) és egy belső velőállományra (medulla). Az E-cadherin+ kizárólag a folliculusok velőállományára jellemző, itt kirajzolva a hám sejtek kapcsolódását, a folliculus asszociált hámokban (FAE) erősebb expressziót mutat (4A. ábra). A medulla ectodermális eredetű, itt a struktúrális vázat a cytokeratin+ csillag alakú retikuláris hámsejtek adják (4B. ábra). A kéreg-velő határon alaphártya húzódik laminint expresszál, amely jól elhatárolja ezeket egymástól (4C. ábra). A kéregállomány mezodermális eredetű, ezt dezmin/vimentin+ mesenchymális retikulum sejtek alkotják (4D. ábra).



4.ábra. A bursa Fabricii folliculusok struktúrális vázát alkotó sejttípusok. (A) E-cadherint kifejező hámsejtek kizárólag a velőállomány alkotásában vesznek részt. **(B)** A cytokeratin+ csillag alakú retikuláris hámsejtek a lymphoid folliculus stromális vázát képezik. **(C)** Laminint az interfollikuláris hám alatt, illetve a kéreg-velő határon húzódó alaphártya tartalmazza, folliculus-asszociált hám alatt hiányzik. **(D)** A kéregállomány alapvázát dezmin+ mesenchymális retikulum sejtek alkotják.

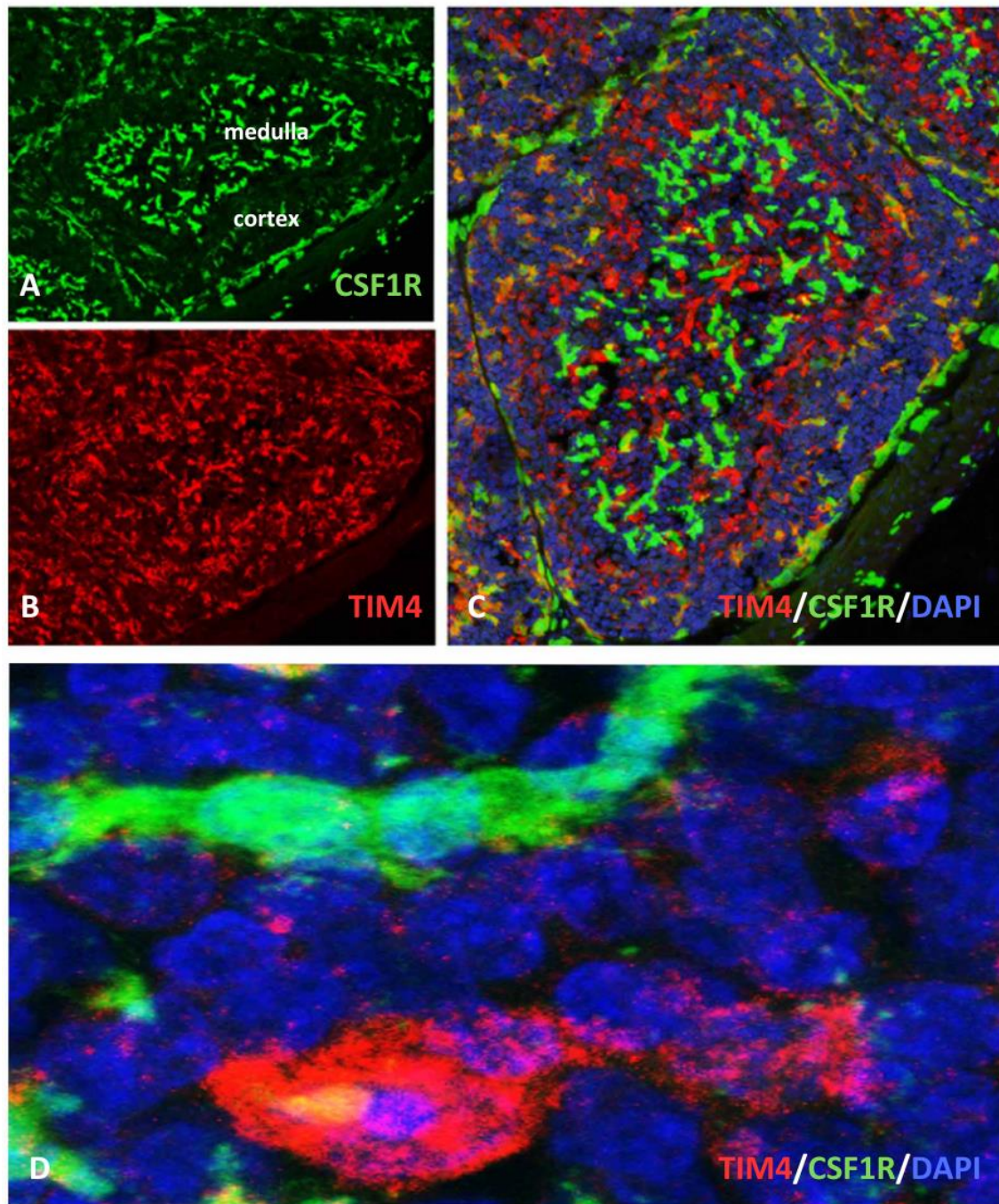
3. A bursa Fabricii myeloid sejtjei

A hisztológusok és immunológusok számára mindig sok bizonytalanság övezte a bursa szekréciós dendritikus sejtek elkülönítését, mivel morfológiai szempontból hasonlóságot mutatnak a lymphoid follikulusok velőállományában előforduló makrofágokkal és limfocitákkal. Korábbi kísérletek a dendritikus sejteket és a makrofágokat egyazon sejttypusnak tekintik, nem különítik el a kettőt egymástól (Hu és mtsai., 2019). Tudományos diákkörös munkám második részében Hu és munkatársai által alkalmazott monoklonális ellenanyagokat használtam fel: a CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor) - tirozin kináz receptort és a TIM4 (T cell Ig and mucin domain-containing 4) - foszfatidilszerin receptort kifejező myeloid sejtek kimutatására. Az immunfluoreszcens festés eredményül azt kaptam, hogy a CSF1R+ sejtek (5A. ábra) kizárólag a follikulusok velőállományában fordulnak elő; szemben a TIM4+ sejtekkel, melyek egyenlő arányban, elszórtan az egész follikulus területén jelen vannak (5B. ábra). Kettős immunfluoreszcens festéssel tudtam igazolni, hogy a CSF1R+ és a TIM4+ sejtek egymástól a velőállományban teljesen elkülönülnek, nem figyelehtő meg kollokalizálás (5C, D. ábra).

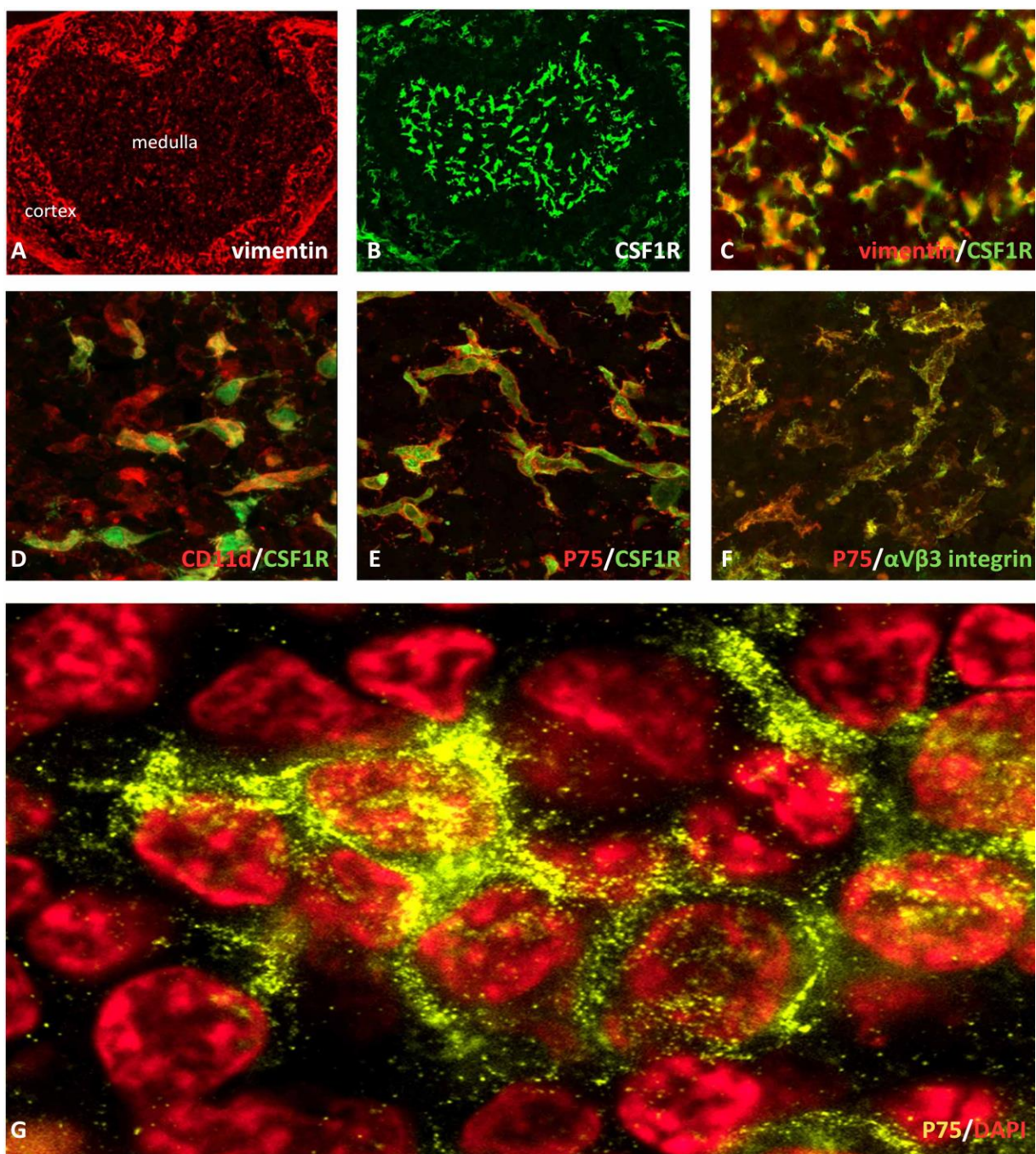
Ahhoz, hogy igazoljam, hogy a CSF1R+ sejtek valóban a bursa szekréciós dendritikus sejtjei, kettős immunfluoreszcens festést végeztem az elsőként leírt dendritikus sejt markerrel (6B. ábra), a vimentinnel ami a sejtekben levő intermedier filamentumokat jelöli (Oláh és Nagy, 2013) . A vimentin jelen van a kötőszöveti sejteken és a dendritikus sejteken is egyaránt, ezért nem specifikus marker, tehát nem lehet kizárólag a dendritikus sejtek karakterizálására használni (6A. ábra). A kettős festéseket elvégezve, a CSF1R-el és a TIM4-el, pozitív eredményt csak a CSF1R esetében kaptam, megfigyeltem a vimentin-CSF1R kollokalizációt, így igazoltam, hogy a CSF1R+ sejtek a bursa velőállományában valóban szekréciós dendritikus sejtek (6C. ábra).

Ennek nyomán további kísérletek következtek új monoklonális ellenanyagokkal, ilyen: az integrinek családjába tartozó CD11d, a sejt felszínén kifejeződő P75 neurotrophin receptort illetve az $\alpha V\beta 3$ integrint felismerő ellenanyagok immuncitokémiai tesztelése. Mindhárom ellenanyag esetében elvégeztem a kettős immunfluoreszcens jelölést CSF1R-el, hogy igazoljam, hogy ezek a molekulák kifejeződnek a dendritikus sejteken felszínén. Eredményeim azt mutatták, hogy a CSF1R - CD11d (6D. ábra), CSF1R - P75 (6E. ábra) és a CSF1R - $\alpha V\beta 3$ integrin (6F. ábra) kettős immunfluoreszcenciát mutatnak, az ellenanyagok kollokalizációja jól felismerhető. Receptor szintű vizsgálatokhoz a P75 fluoreszces festést STED szuper rezolúciós mikroszkóppal is

megnéztem. Ezzel a módszerrel kirajzolódnak a sejt felszínén kifejeződő receptorok, illetve a sejt nyúlványos morfológiája is jobban kivehető (6G. ábra).



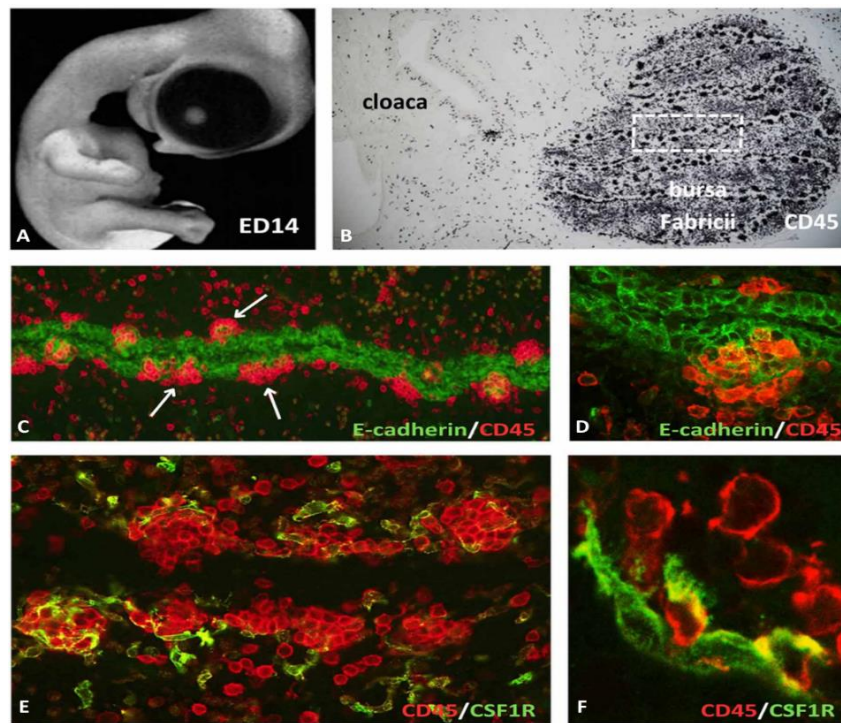
5.ábra. A bursa Fabricii nyúlványos sejtjei: dendritikus sejtek és makrofágok. (A) A lymphoid folliculus velőállományában nagy számú CSF1R⁺ dendritikus morfológiát mutató sejtek lokalizálódnak. (B) A TIM4⁺ makrofágok egyenletesen oszlanak el a kéreg- és a velőállományban egyaránt. (C, D) A CSF1R⁺ dendritikus sejtek nem kollokalizálnak a velőállományban előforduló TIM4⁺ makrofágokkal; DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride) sejtmagot jelöl.



6.ábra. A bursa szekréciós dendritikus sejtjeire (BSDC) jellemző specifikus ellenanyagok bemutatása. (A) A vimentin immunreakció BSDC-et jelöl a velőállományban és a kérgi retikuláris sejtálózatot is kirajzolja. **(B)** A velőállományban hasonló mintázat jellemző a CSF1R immunreaktív sejtekre. A CSF1R⁺ nyúlványos sejtek a folliculus velőállományában csoportosulnak. Elszórtan a cortexben is van néhány nyúlványos sejt. **(C)** Vimentin/CSF1R kettős pozitivitás igazolja, hogy a CSF1R ellenanyag csirkében BSDC-t jelöl. **(D-F)** Kettős immunfluoreszcens festéssel igazolt új monoklonális ellenanyagok a BSDC-k karakterizálására: CD11d integrin, P75 neurotrophin receptor és az $\alpha V\beta 3$ integrin. **(G)** STED mikroszkóppal készített szuper rezolúciós felvétel: a P75 neurotrophin receptor eloszlása a BSDC-k felszínén.

4. A bursa Fabricii morfológiája és sejtjes összetétele az embriónális fejlődés 14. napján

Kísérletes munkám harmadik részében a bursa Fabricii embrionális fejlődés során vizsgáltam, a munkám központjában álló dendritikus sejtek fejlődését. Ehhez a 14 napos csirke embriót vettem kezdeti stádiumnak (7A. ábra), mivel az embrionális fejlődés 13. napjára a fejlődő bursában a redők már teljesen kitöltik a szerv lumenét és a follikulus bimbók korai megjelenése jól megfigyelhető (7B. ábra). Kimutattam, hogy a follikulus bimbókat benépesítő sejtek kifejezik a CD45 molekulát, ami arra utal, hogy vérképző őssejtek alakítják ki a lymphoid follikulusokat. A follikulus bimbók alkotásában a CD45+ sejtek mellett részt vesznek az E-cadherin+ hámsejtek is, melyek benőnek a redők mesenchymális rétegeibe, körbeveszik a vérképző sejteket, így alakítva ki a follikulus bimbókat (7C, D. ábra). Follikulus kezdeménybe érkeznek meg a myeloid sejtek prekurzorai mint a CSF1R+ dendritikus sejtek és a makrofágok (7E, F. ábra).



7.ábra. A bursa Fabricii fejlődési állapota a 14. embrionális napon (ED). (A) 14 napos csirke embrió sztereomikroszkópos felvétele. (B) A 14 napos csirke embrióból izolált szervkomplexum: vastagbél, BF, kloáka hosszszelvénye; és CD45+ vérképző őssejtek bursába történő akkumulációja figyelhető meg. (C, D) Follikulus bimbók: CD45+ vérképző őssejteket körbenövi az E-cadherin+ hám, így alakítva ki a follikulus bimbókat. (E, F) A follikulus bimbókba csoportosuló CSF1R+ dendritikus sejtek, már a korai embrionális stádiumban is jelen vannak és bevándorolnak a hámsejtek közé.

Következtetések

Kísérletes munkám során kimutattam, hogy az E-cadherin+ hámsejtek, chB6+ B limfociták és TIM4+ makrofágok mellett, a CSF1R specifikus monoklonális ellenanyaggal szelektíven lehet jelölni a BSDC-ket embryonális és felnőtt BF-ben is. További kettős immunfluoreszcens festéssel igazoltam, hogy a CSF1R+ BSDC-k CD11d, P75-neurotrophin receptor és $\alpha V\beta 3$ integrin expresszálnak. Ezeket a felszíni molekulákat korábban még nem írták le madár dendritikus sejteken.

A bursa Fabricii morfológiáját és szöveti szerkezetét vizsgálva a lymphoid follikulusok két részre oszthatóak. Felépítésüket tekintve eltérőek, a medullát a kísérletes munkám központjában álló CSF1R/CD11d/P75/ $\alpha V\beta 3$ integrin+ szekrécios dendritikus sejtek mellett chB6/BAFF-R B-limfociták, TIM4+ makrofágok, illetve E-cadherin/cytokeratin+ retikuláris hámsejtek alkotják. A kéregállomány sejtes összetétele a következő: dezmin/vimentin+ retikulum sejtek, TIM4+ makrofágok, illetve chB6/BAFF-R/CXCR4+ B-limfociták alkotják.

Az általam tanulmányozott monoklonális ellenanyagokat: anti-CSF1R, CD11d, P75 és az $\alpha V\beta 3$ integrin korábban nem írták le csirkében a szekrécios dendritikus sejtek jelölésére alkalmas ellenanyagokként. A kolónia stimuláló faktor 1 receptor (CSF1R), tirozin kináz receptor, a sejtek külső felszínén helyezkedik el, a sejtek növekedésében, érésében és differenciálódásában játszik szerepet. A CD11d az integrinek családjába tartozik, egy korábbi publikációban csirke szekunder nyirokszervek és a keringő limfocitákon írja le (Deeg és mtsai., 2020). Kísérletes munkám során kettős immunfluoreszcens festéssel igazoltam, hogy a bursa szekrécios dendritikus sejtek is expresszálnak. A P75 neurotrophin receptor, emlősökben a neurális eredetű sejteken, főként a neuronok korai fejlődési szakaszaiban fejeződik ki, a sejt túlélését biztosító mechanizmusokban játszik szerepet (Ritala és mtsai., 2022). Igazoltam, hogy expressziója megfigyelehető csirke bursa Fabricii-ban, specifikusan a szekrécios dendritikus sejteken. Emlősökben az $\alpha V\beta 3$ integrin a vitronektin receptora, amely egy glikoprotein, sejtkapcsolódásban játszik szerepet. Az előző monoklonális ellenanyagokhoz hasonlóan az $\alpha V\beta 3$ integrin kifejeződését a bursa szekrécios dendritikus sejteken immunfestésekkel bizonyítottam.

Mindegyik molekula (CSF1R, CD11d, P75 és az $\alpha V\beta 3$ integrin), sejtfelszíni expressziót mutat és ez kiváló lehetőséget nyújt a sejt izolációs kísérletekhez való felhasználásra, így egyre közelebb kerülünk a bursa szekrécios dendritikus sejtek megismeréséhez és teljes körű karakterizálásához, molekuláris tulajdonságai jellemzéséhez.

Összefoglaló

A csirke mint kísérletes modellszervezet kulcsszerepet játszik napjaink immunológiai, sejtbiológiai és embriológiai kutatásaiban, hiszen egyik nagy előnye, hogy könnyen elérhető és nem drága a transzgénikus állatokkal szemben. A bursa Fabricii a madarakra jellemző primér nyirokszerv. A velőállományban található retikuláris hámsejtek és szekréciós dendritikus sejtek (BSDC) hozzák létre a bursa specifikus mikrokörnyezetét, amely kulcsszerepet tölt be a B-limfocita prekurzorok érésében. A B-limfociták az adaptív immunrendszer részei, szerepet játszanak a humorális immunválasz kialakításában, így védekezve a patogénekekkel szemben.

Kísérletes munkám során felnőtt, illetve eltérő embrionális fejlődésben levő csirkék primér nyirokszervét, a bursa Fabriciit vizsgáltam. Ehhez a szervet boncolás során eltávolítottam, a hisztológiai protokollnak megfelelően előkészítettem, fixáltam, majd különböző immuncitokémiai és immunfluoreszcens festéssel vizsgáltam. A metszeteken megfigyelehető volt a bursa Fabricii jellegzetes morfológiája: a szervet redők alkotják, melyek kitöltik a lument, a redőkben pedig gyöngyfüzér szerűen lymphoid follikulusok helyezkednek el. A fent leírt ellenanyagokkal történő jelölések következtében láthatóvá vált a lymphoid follikulusok struktúrális és sejtes szerveződése is: külső kéregállomány melyre retikulumsejtek, makrofágok és B-limfociták jellemzőek; és egy belső velőállomány amit dendritikus sejtek, B-limfociták, makrofágok és retikuláris hámsejtek alkotnak. A kísérletes munkám központjában a bursa szekréciós dendritikus sejtjei álltak. Kiemelt célom ezeknek a sejteknek a karakterizálása olyan új monoklonális ellenanyagokkal, melyeket még nem írtak le csirke bursa dendritikus sejtjein, ide tartozik: CSF1R, CD11d, P75 és az $\alpha V\beta 3$ integrin antigéneket jelölő ellenanyagok.

Az új monoklonális ellenanyag repertoár bevezetésével a jövőben lehetőség nyílik sejtizolációs kísérletek elvégzésére, a sejtek in vitro tenyésztésére, in vivo transzplantációjára. Ezt követően tervezzük a bursa szekréciós dendritikus sejtjeinek molekuláris vizsgálatát, ami lehetőséget biztosít a sejt ultra struktúrájának a megismerésére. Kulcsfontosságú megértenünk e sejt működését ahhoz, hogy tanulmányozhassuk miként befolyásolja a B-limfociták embrionális érését.

Hivatkozások

Abdou N. I., és Abdou N. L. (1972): **Bone marrow: The bursa equivalent in man?**. Science. 175, 4020.: 446–448.

Balic A., Chintoan-Uta C., Vohra P., Sutton K. M., Cassady-Cain R. L., Hu T., Donaldson D. S., Stevens M. P., Mabbott N. A., Hume D. A., Sang H. M. és Vervelde L. (2019): **Antigen sampling csf1r-expressing epithelial cells are the functional equivalents of mammalian m cells in the avian follicle-associated epithelium**. Frontiers in Immunology.10: 1–16.

Ciriaco E., Píñera P. P., Díaz-Esnal B. és Laurà R. (2003): **Age-Related Changes in the Avian Primary Lymphoid Organs (Thymus and Bursa of Fabricius)**. Microscopy Research and Technique. 62, 6.: 482–487.

Cooper, M.D., Peterson, R.D.A., és Good, R.A. (1965). **Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken**. Nature. 205, 143-146.

Deeg A.C., Degroote L.R., Giese M.I., Hirmer S., Amann B., Weigand M., Wiedemann C., Hauck M.S. (2020): **CD11d is a novel antigen on chicken leukocytes**. Journal of Proteomics. 225

Felföldi B., Imre G., Igyártó B., Iván J., Mihalik R., Lackó E., Oláh I. és Magyar A. (2005): **In ovo vitelline duct ligation results in transient changes of bursal microenvironments**. Immunology. 116, 2.: 267–275.

Glick B., Chang T.S. és Jaap R.G. (1956): **The bursa of Fabricius and antibody production**. Poultry Science. 35, 1.: 224–225

Hu T., Wu Z., Bush S. J., Freem L., Vervelde L., Summers K. M., Hume D. A., Balic A. és Kaiser P. (2019): **Characterization of Subpopulations of Chicken Mononuclear Phagocytes That Express TIM4 and CSF1R**. The Journal of Immunology. 202, 4.: 1186– 1199.

Lippincott-Schwartz J. és Fambrough D. M. (1987): **Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: Kinetic and morphological analysis**. Cell. 49, 5.: 669–677.

Madej J. P., Chrzagonekstek K., Piasecki T. és Wieliczko A. (2013): **New insight into the structure, development, functions and popular disorders of Bursa Fabricii**. Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia. 42, 5.: 321–331.

Nagy N., Magyar A., Tóth M. és Oláh I. (2004): **Origin of the bursal secretory dendritic cell**. Anatomy and Embryology. 208, 2.: 97–107.

Nagy N., és Olah I. (2010): **Experimental evidence for the ectodermal origin of the epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius.** Development. 137, 18.: 3019–3023.

Nagy N., Bódi I. és Oláh I. (2016): **Avian dendritic cells: Phenotype and ontogeny in lymphoid organs.** Developmental and Comparative Immunology. 58. 47–59.

Nagy N., Busalt F., Halasy V., Kohn M., Schmieder S., Fejszak N., Kaspers B. és Härtle S. (2020): **In and Out of the Bursa—The Role of CXCR4 in Chicken B Cell Development.** Frontiers in Immunology. 11, 1–18.

Nagy N., és Oláh I. (2010): **Experimental evidence for the ectodermal origin of the epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius.** Development. 137, 18.: 3019–3023.

Olah I., és Glick B. (1978): **The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius.** Poultry science. 57, 5.: 1445–1450.

Oláh I., Glick B. és Törö I. (1986): **Bursal Development in Normal and TestosteroneTreated Chick Embryos.** Poultry Science. 65, 3.: 574–588.

Olah I., és Glick B. (1992): **Follicle-associated epithelium and medullary epithelial tissue of the bursa of Fabricius are two different compartments.** The Anatomical Record. 233, 4.: 577–587.

Oláh I., és Nagy N. (2013): **Retrospection to discovery of bursal function and recognition of avian dendritic cells; Past and present.** Developmental and Comparative Immunology. 41, 3.: 310–315.

Oláh I., Nagy N. és Vervelde L. (2013): **Structure of the Avian Lymphoid System.** Avian Immunology: Second Edition. Editors: Schat K. A., Kaspers B., Kaiser P., Academic Press. 11-14.

Pharr T., Olah I., Bricker J., Olson W. C., Ewert D., Marsh J. és Glick B. (1995): **Characterization of a novel monoclonal antibody, EIV-E12, raised against enriched splenic ellipsoid-associated cells.** Hybridoma. 14, 1.: 51–57.

Pospisil R., és Mage R. G. (2011): **Rabbit Appendix: A Site of Development and Selection of the B Cell Repertoire.** Curr. Top. Microbiol. Immunol. 229: 59-70.

Reynaud C. A., Mackay C.R., Müller R.G. és Weill J. C. (1991): **Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: The sheep ileal Peyer's patches.** Cell. 64, 5.: 995–1005.

Ribatti D., Crivellato E. és Vacca A. (2006): **The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage.** Clinical and Experimental Immunology. 145, 1.: 1-4.

Ribatti D., Porzionato A., Emmi A. és De Caro R. (2020): **The bursa of Hieronymus fabricius AB aquapendente: From original iconography to most recent research.** Romanian Journal of Morphology and Embryology. 61, 2.: 583–585.

Ritala J.F., Lyne S.B., Sajanti A., Girard R., Koskimäki J. (2022): **Towards a comprehensive understanding of p75 neurotrophin receptor functions and interactions in the brain.** Neural Regen Res. 17(4):701-704.