

A bursa Fabricii dendritikus sejtjeinek karakterizálása egy új monoklonális ellenanyaggal

Szerző:

Harmati Petra-Anikó

Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Biológia és Geológia Kar, biológia szak,
alapképzés, III. év

Témavezető:

Dr. Nagy Nándor habilitált egyetemi docens,

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Humánmorfológiai és
Fejlődésbiológiai Intézet – Budapest

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
BEVEZETÉS	2
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
1. A bursa Fabricii immunológiai jelentősége	3
2. A bursa Fabricii főbb jellemzői és szerkezete	3
3. A bursa Fabricii medulláris sejtípusai	5
CÉLKITŰZÉSEK	6
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	7
1. Kísérleti állatok	7
2. Minták feldolgozása	7
2.1. A fagyasztott zselatinos blokk elkészítése	7
2.2. A fagyasztott májas blokk elkészítése	7
3. Fagyasztott blokkok metszése	7
4. A metszetek immuncitokémiai és immunfluoreszcens vizsgálata	8
4.1. Immuncitokémia	8
4.2. Kettős immunfluoreszcens festés	9
4.3. Felhasznált ellenanyagok	10
5. A metszetek kiértékelése	10
EREDMÉNYEK	11
1. A felnőtt bursa immuncitokémiai jellemzése	11
2. A felnőtt bursa immunfluoreszcens festése	13
3. Konfokális pásztázó mikroszkópia felnőtt bursán	13
4. A 10C12 antigén kifejeződése egyéb nyirokszervekben	15
5. A 10C12 antigén kifejeződése az embrionális fejlődés során	15
KÖVETKEZTETÉS	17
BIBLIOGRÁFIA	18

BEVEZETÉS

Az embriológiai kutatásokban rendkívül fontos szerep jut a monoklonális ellenanyagoknak, amelyek egy bizonyos sejt típusra specifikus molekulát ismernek fel. A monoklonális antitesteket szomatikus hibridizációval (hibridoma módszerrel) állítják elő. A többszöri klónozásnak alávetett hibridomák, antitesteket termelnek, amelyeket karakterizálni kell. A jellemzés során meghatározzák az antitest által jelölt sejt típusát, szöveti és szervezeten belüli eloszlását, vizsgálják a keresztreakciót más fajokkal, illetve megpróbálják meghatározni, a felismert antigén pontos sejtbeli lokalizációját és biokémiai tulajdonságait. Egy megfelelően karakterizált antitest ma már széles körben alkalmazott a laboratóriumi kutatások során.

A csirke, mint modellállat mellett, több érv is szól. Elsősorban azért használják ezeket az állatokat a különböző immunológiai és fejlődésbiológiai vizsgálatokhoz, mert beszerzésük és tartásuk nem túl költséges és nem túl körülményes. Ezen kívül a tojásban levő embrió manipulációja, sokkal egyszerűbb, mint az emlős modellállatokon, pl. az egéren végzett technikák. A csirke sejtekre számos specifikus sejtmarker létezik, így megfelelő alany a kimérák készítéséhez, ezáltal lehetővé válik a sejtek differenciálódásának és vándorlásának nyomon követése az embrióban.

A Semmelweis Egyetem Fejlődésbiológia Laborjában mindennaposan alkalmaznak immuncitokémiai technikákat, felhasználva számos specifikus antitest, amelyek közül jó néhány nyirokszervi sejtre készült specifikus egér monoklonális ellenanyag ebben a laboratóriumban lett előállítva. A laborban főként a vérképző őssejtek differenciálódását követik nyomon a nyirokszervek fejlődése során. A bursa Fabricii, mint a madarak specifikus nyirokszerve a B-limfociták differenciálódásának helye. A bursában található szekréciós dendritikus sejtek, együtt a bursai follikulusok vázát alkotó retikuláris hámsejtekkel, olyan mikrokörnyezetet hoznak létre, amely a B-sejtek éréséhez elengedhetetlenek.

Az elmúlt években ösztöndíj révén, összesen 2 hónapot töltöttem el ebben a laboratóriumban és Dr. Nagy Nándor vezetése alatt egy új monoklonális ellenanyag (klónnév: 10C12) karakterizálását végeztem el csirke bursán és egyéb nyirokszerveken.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A bursa Fabricii immunológiai jelentősége

A bursa Fabricii nevét felfedezőjéről, Hieronymus Fabricius ab Aquapendente-ről kapta, aki a paduai egyetem diákja, majd tanára is volt. Ő írta le a szervet 1621-ben a *De Formatione Ovi et Pulli* című munkájában (Ribatti, Crivellato & Vacca 2006). A bursa pontos szerepére azonban csak 1956-ban derült fény, egy érdekes véletlen folytán, amely felfedezés mérföldkönek számított az immunológiában. Ekkor ugyanis az ohioi egyetemen Bruce Glick fiatal csirkék bursájának eltávolításával kísérletezett, de nem jutott eredményre a szerv funkciójával kapcsolatban. A véletlen úgy hozta, hogy az egyetemen dolgozó Timothy Scott Chang-nek madarakra volt szüksége, hogy *Salmonella* ellen antitesteket termeltesen és pont a Glick által vizsgált csirkéket immunizálta e célból. Egy héttel később, amikor az antitesteket szeretne volna tesztelni, azt tapasztalta, hogy a madarak többsége nem termelt ellenanyagot. Amikor Chang egyeztetett Glick-kel igazolódott az, hogy az immunizált madarak többsége manipulált, bursa nélküli volt (Taylor & McCorkle 2009). Így jutottak arra a feltételezésre, hogy a bursának az antitest termelésben és az immunválaszban van szerepe, ezt pedig kísérletekkel is igazolták (Glick, Chang & Jaap 1956).

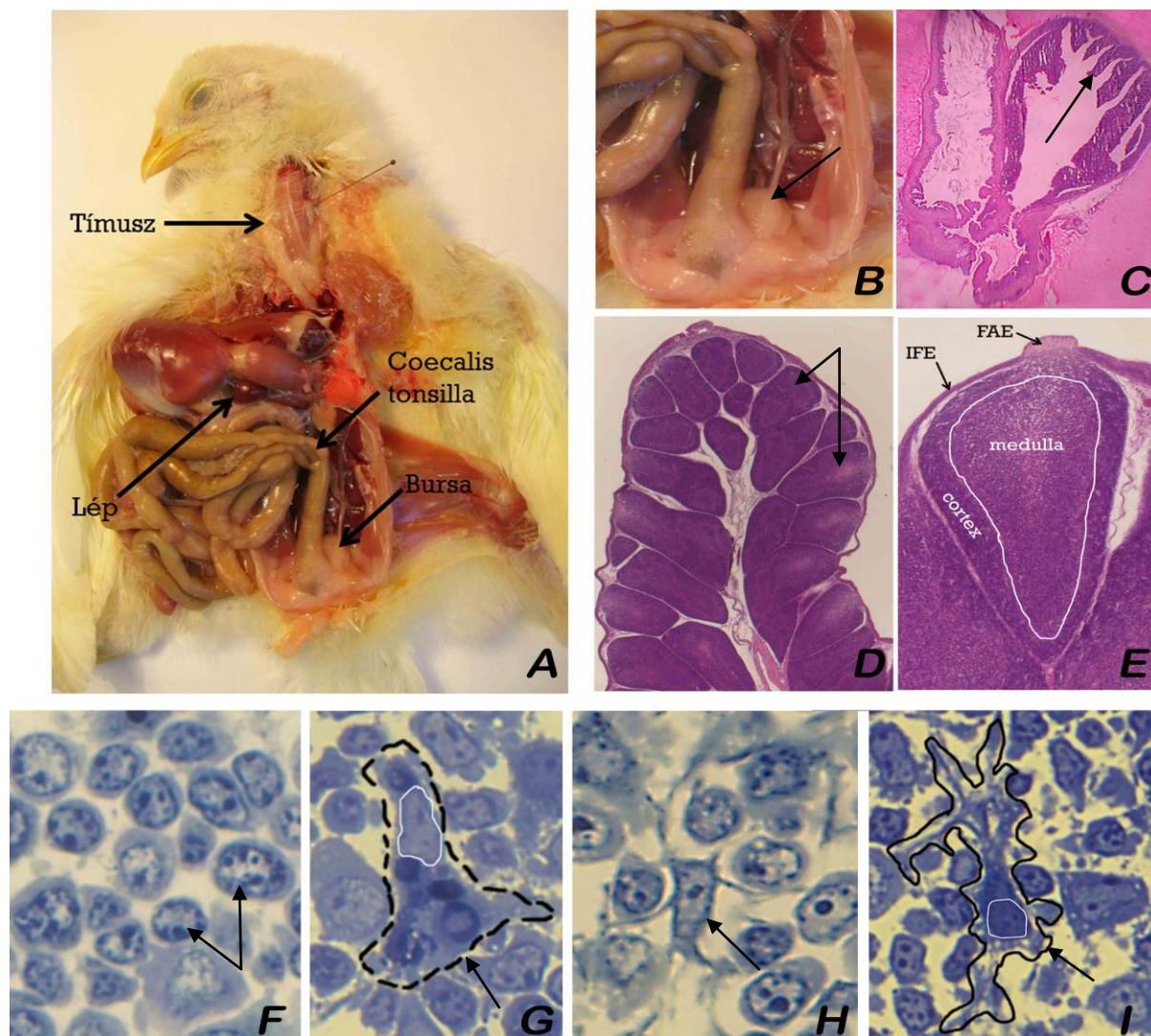
2. A bursa Fabricii főbb jellemzői és szerkezete

A bursa Fabricii a kloáka dorzális részén található lumenjén keresztül pedig kapcsolatban áll a vastagbéllel (1A. ábra), kifejllett csirkében 1,7 cm átmérőjű ovális üreges szerv (1B. ábra). Bár embrionális eredete sokáig bizonytalan volt, a legújabb kutatások arra utalnak, hogy a bursa az ektodermából alakul ki (Nagy & Oláh 2010).

A bursa Fabricii izmos tokban helyezkedik el, a lument hosszanti irányba 15–20 redő tagolja (1C. ábra), amelyet számos follikulus tölt ki (1D. ábra). A follikulusok hosszúkás ovális alakúak és a bursa alapegységét képezik (1E. ábra). Szerkezetükben elkülöníthetünk egy külső tömöttebb kéregállományt (cortexet) illetve egy sejtsebényebb velőállományt (medullát). A follikulusok felszínét interfollikuláris epitélium (IFE) borítja, kivétel a csúcsi részt, ahol follikulus-asszociált epitélium (FAE) található. A FAE teremti meg a kapcsolatot a bursa lumene és a follikulusok medulláris állománya között. A többi hámsejtől eltérően a FAE alatt nincs bazális lamina, helyette FAE-támasztó sejtek sorai találhatóak.

A velőállomány stromális sejthálózatát retikuláris epitélium és szekréciós dendritikus sejtek alkotják, amelyek megteremtik a B-limfociták éréséhez szükséges mikrokörnyezetet. A kéregállomány alapvázát a medullától eltérően retikuláris kötőszövet alkotja, amely extracelluláris mátrixot is termel (Oláh, Nagy & Vervelde 2014).

A bursában 3 hónapos kor után jelentkeznek az involúcióval járó változások, ezek azonban nagyon eltérőek lehetnek a fajok között. A bursa involúciója White Leghorn csirkék esetén a 20. hét körül kezdődik és a 28. hétre be is fejeződik. Ez alatt a kéreg és a velőállomány vázának folyamatos leépülése figyelhető meg. Ezt követően a bursában nem zajlanak B-sejt érésével kapcsolatos folyamatok (Ciriaco *et al.* 2003).



1. ábra: A bursa Fabricii elhelyezkedése és szerkezete. (A) Kiboncolt csirke és a primer illetve szekunder nyirokszervek elhelyezkedése. (B) Kinagyított kloákalis régió, bursa elhelyezkedése (nyíllal jelölve). (C) Bursa, kloáka és vastagbél hosszszelvénye, bursa lumenjében több hosszanti redővel (nyíllal jelölve). (D) Kinagyított bursai redő, tömve follikulusokkal (nyilakkal jelölve). (E) Kinagyított bursai follikulus, az ezt borító follikulus-asszociált hám (FAE) illetve az interfollikuláris hám (IFE) valamint a follikulus két fő része, a kéregállomány (cortex) és a velőállomány (medulla). (F–I) A bursai follikulusok medulláris sejtípusai: (F) limfociták, (G) makrofág, (H) retikuláris hámsejt, (I) szekréciós dendritikus sejt.

3. A bursa medulláris sejtípusai

A bursa medulláris részét négy fő sejtípus alkotja: limfociták, makrofágok, retikuláris hámsejtek és szekrécios dendritikus sejtek (BSDC).

Az itt található limfociták többsége **B-limfocita** (1F. ábra). Ezek a sejtek kerek, heterochromatikus (sötétre festődő) sejtmaggal. A **makrofágok** nyúlványos sejtek, euchromatikus (világos) sejtmaggal (1G. ábra). E sejtek citoplazmájában fagocitált sejtörmelék található. A medulla makrofágjai eltérnek a máshol találhatóaktól, a kutatások arra utalnak, hogy ezek valószínűleg előregedett BSDC-ek (Olah & Glick 1992). A **retikuláris hámsejtek** csillag alakúak, felszínük sima, sejtmagjuk szintén euchromatikus (1H. ábra). Ezek a sejtek hálózatot alkotnak, így biztosítva alapvázát a medullát kitöltő limfocitáknak. A **szekrécios dendritikus sejteket** Oláh Imre és Bruce Glick írta le először 1978-ban. Ezek a sejtek szintén nyúlványosak, sejtmagjuk pedig a limfociták sejtmagjára emlékeztető kerékküllő mintázatot ad, heterochromatikus (1I. ábra). A bursai dendritikus sejtek plazmamembránja alatt granulumok figyelhetők meg, amelyek tartalma eddig ismeretlen. Ez is utal arra, a sejtfelszín szeldelt mivoltával együtt, hogy a bursa dendritikus sejtjei szekrécios tevékenységet folytatnak. Továbbá, mint antigén prezentáló sejtek, fontos szerepet játszanak a B-limfociták érésében (Olah & Glick 1978) (Olah & Glick 1987).

CÉLKITŰZÉSEK

A Semmelweis Egyetem Fejlődésbiológia Laboratóriuma együttműködve a müncheni Ludwig-Maximilians Egyetem Élettani Intézetével olyan bursai sejtek ellen termeltetett egér monoklonális ellenanyagok előállítását tűzte ki célul, amelyek alkalmas eszközök lehetnek a bursa Fabricii sejttypusainak elkülönítésére és jellemzésére. Az előzetes adatok alapján, a 10C12 nevű antitest olyan B-sejt szubpopulációt jelölt, amely eloszlása alapján, csak a follikulusok velőállományában található meg (Rottach 2012). Mivel a 10C12 mAb által jelölt sejtek alakja jelentősen eltért a limfocitáktól, a laborban előzetes tesztelést végeztünk, amiből arra következtettünk, hogy ez az antitest a bursa velőállományában, valójában olyan nyúlványos sejteket jelöl, amelyek dendritikus sejteknek felelhetnek meg.

Kutatásom során a 10C12 monoklonális ellenanyag részletes immunológiai karakterizálását végeztem el különböző korú embriók és felnőtt madarak nyirokszervein. A célkitűzéseim a következők voltak:

- A bursa Fabricii karakterizálása a 10C12 nevű ellenanyaggal és összehasonlítása B-sejt, hám és dendritikus sejtmarkerekkel.
- A 10C12 molekula kifejeződésének vizsgálata a bursa embrionális fejlődése során.
- A 10C12 molekula expressziós mintázatának meghatározása a felnőtt nyirokszervekben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

A kísérlethez elsősorban White Leghorn csirke embriókat és 6–8 hetes egyedeket használtuk. Ezen kívül a 10C12 antitestet teszteltük 8 hetes kacsra, gyöngytyúkok, fürj és fogoly nyirokszerveken is.

2. A minták szövettani feldolgozása

A különböző korú embriókból és felnőtt egyedekből származó szerveket májba vagy fixálás után zselatinba ágyaztuk be, majd fagyasztott blokkokat készítettünk, amelyeket kriotómmal metszettünk. Az így elkészült metszeteken immuncitokémiai illetve immunfluoreszcens festéseket végeztünk.

2.1. A fagyasztott zselatinos blokk elkészítése

A feldolgozni kívánt szerveket 1 órán keresztül 4%-os paraformaldehidben (PFA) fixáljuk, majd ezt követően háromszor mossuk 5 percet hagyva a mosások közt. A mosást foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) végezzük. A mosás után a szervekre 15%-os szacharóz oldat kerül és ez egy éjszakát áll 4°C-os hűtőben. A beágyazáshoz 7,5%-os zselatint használunk. A szerveket a beágyazás előtt zselatinba helyezzük és 37°C-on 1 órát tároljuk. Ezt követően műanyag tálkákat félig megtöltünk zselatinnal figyelve arra is, hogy ne legyen buborék, mivel ez a fagyasztáskor töréshez vezethet. Amikor a zselatin megkötött a szerveket ráhelyezzük és sztereomikroszkóp alatt megfelelően orientáljuk. Ezután 5 percet várunk, hogy a szervek hozzátapadjanak a zselatin alaphoz, majd annyi meleg zselatint öntünk a tálkába, hogy az ellepje a szerveket. A tálkákat 4°C-os hűtőbe helyezzük, míg a zselatin teljesen megköt. A tálkákból kivágjuk a megfelelő méretű zselatin blokkot, majd ezt Shandon Cryomatrix segítségével előre feliratozott kartonpapírra ragasztjuk, és filctoll segítségével bejelöljük a metszés irányát. Az így elkészült blokkot folyékony nitrogénben -60°C-ra lehűtött izopentánban (Sigma-Aldrich, M32631) fagyasztjuk pár percig. A fagyasztott blokkok akár azonnal is metszhetőek vagy felhasználásig -80°C-on tárolhatóak.

2.2. A fagyasztott májas blokk elkészítése

A májas blokk készítésekor a vizsgálni kívánt szerveket májjal vesszük körbe. Egy kartonpapírra májszeletet helyezünk, majd rátesszük a vizsgálni kívánt szerveket és ezeket körberakjuk és befedjük májdarabokkal odafigyelve arra, hogy minél kevesebb levegővel töltött rés maradjon. Az így elkészült májas blokkot folyékony nitrogénben fagyasztjuk és -80°C-on tároljuk felhasználásig.

3. A fagyasztott blokkok metszése

Az elkészült zselatinos illetve májas blokkokat Shandon gyártmányú kriotómmal metszettük. A zselatinos blokkokat -24°C-on, míg a májas blokkokat -19°C-on kell metszeni. A blokkokat leválasztjuk a kartonpapírról, majd szintén Shandon Cryomatrix segítségével felragasztjuk a kriotóm blokktartójára, majd a kriosztátba helyezve addig várunk, amíg a ragasztó megköt. A blokkokból 8-12 µm vastagságú metszeteket készítünk, amelyeket poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezekre veszünk fel. A májas blokkok esetén a fixálás utólagosan történik, ekkor a metszeteket tartalmazó tárgylemezeket 10 percig acetona helyezzük, majd hagyjuk ezeket megszáradni. A metszeteket hűtőben tároljuk a felhasználásig.

4. A metszetek immuncitokémiai és immunfluoreszcens vizsgálata

Az elkészült metszetek alkalmasak, különböző szövettani festési technikákat alkalmazva, a szervek sejtszintű szerkezetének tanulmányozására. A csirkék nyirokszerveinek metszeteit tartalmazó lemezeket immuncitokémiai illetve kettős immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk.

4.1. Immuncitokémia

A metszeteket tartalmazó lemezeket 10 percig PBS oldatot tartalmazó küvettában rehidratáljuk. A zselatinos metszeteket rehidratáció után PBS-ben hagyva 15 másodpercig mikrohullámú sütőbe helyezve melegítjük, ezzel biztosítva a zselatin kioldódását. A rehidratáció után következik a primer ellenanyagok rámerése a tárgylemezekre levő metszetekre. A használt ellenanyagok listáját az 1. táblázat tartalmazza. Ez előtt azonban a tárgylemezeket gondosan le kell törölni papírvattával, figyelve a metszetek épségének megőrzésére. Erre azért van szükség, hogy a különböző ellenanyagok ne folyhassanak össze. A primer ellenanyagokból kb. 70 µl kerül egy metszetre és 45 percig áll rajtuk, eközben a lemezek vizes kamrában lefedve tárolódnak szobahőmérsékleten, elkerülve a kiszáradást. Ezután óvatosan leöntjük az ellenanyagot, majd 3x5 perces PBS-es mosás következik. A lemezek törlése után rákerül a metszetekre a hígított (a hígítást PBS-BSA oldattal végezzük) biotinilált szekunder ellenanyag, amely szintén 45 percet áll, hasonlóan az előző körülményekhez. Eközben elkészítjük avidin-biotin-peroxidáz komplexet (ABC), amely fél órát áll 4°C-os hűtőben. Ebben az esetben a hígításhoz sima PBS-t használunk. A 45 perc lejártá után leöntjük a szekunder ellenanyagot, 3x5 percig mossuk, majd peroxidos blokkolást végzünk. Ennek célja a szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolása. A blokkolás során PBS-t tartalmazó küvettába 30%-os H₂O₂ oldatot adagolunk, majd belehelyezzük a tárgylemezeket és 10 percig állni hagyjuk őket. A 3x5 perces mosást követően a metszetekre

rákerül az ABC-oldatot és 30 percet így inkubálnak. Ezalatt kloronaftol törzsoldatot hígítunk ki PBS-ben (50 ml PBS + 50 µl kloronaftol) majd ezt fél órán át sötétben kevertetjük mágneses keverővel. Az oldatot szűrőpapíron átszűrjük és sötétben tároljuk felhasználásig. Az ABC-vel történő inkubálás befejeztével ismét mosás következik (3x5 perc PBS-el) majd a lemezek az előzőleg elkészített kloronaftolos oldatban hívódnak elő. Ezzel mutatjuk ki a kötődött peroxidáz enzim aktivitását, amelyet lilás szín jelez. A kloronaftolt tartalmazó küvettába 3%-os H₂O₂ oldatot adagolunk, majd belehelyezzük a lemezeket és 30 percig sötétben tároljuk ezeket. Legvégül ismét PBS mosás, majd vízdékony lefedőanyaggal történő lefedés következik. Az így elkészült lemezeket 4°C-on tároljuk.

4.2. *Kettős immunfluoreszcens festés*

A 10C12 antitest más ellenanyaggal való kolokalizációjának vizsgálatára kettős immunfluoreszcens festést alkalmaztunk.

E festés során először rámérjük az első primer ellenanyagot a metszetekre, amelyet a már ismertetett módon inkubálunk 45 percig. Mosást (3x5 perc PBS) követően fluorokrómmal kapcsolt szekunder ellenanyagot (Invitrogen, Life Technologies) pipetázunk a metszetekre majd ezeket sötétben tárolva ismét 45 percet várunk. Ezután ismét egy primer ellenanyag rámerése következik, 45 perc fénytől védett inkubáció, mosás majd az előzőtől eltérő fluoreszcenciájú és izotípusú fluorokrómmal kapcsolt szekunder ellenanyag rámerése következik. Az inkubáció 30. percében a sejtmagok festésére használt DAPI-t (4,6 diamidino-2-phenylindole) is rámérjük a metszetekre, majd 15 perc elteltével mosás és lefedés következik.

4.3. Felhasznált ellenanyagok

1. táblázat: A felhasznált primer és szekunder ellenanyagok

Primer ellenanyagok	Izotípus
anti-vimentin (klón: 3B4)	IgG2A
anti-cytokeratin (klón: Lu5)	IgG1
biotinilált-anti csirke IgG	
anti-csirke makrofág marker (klón: 74.2)	IgG1
anti-csirke Bu-1, B-sejt marker (klón: BoA1)	IgG1
anti-csirke dendritikus sejt marker (klón: 74.3)	IgG1
anti-csirke dendritikus sejtmarker (klón: 10C12)	ismeretlen
Szekunder ellenanyagok	
biotinilált anti-egér IgG	
fluorokrómmal kapcsolt ALEXA-488-konjugált anti-egér IgG2A	
fluorokrómmal kapcsolt ALEXA-594-konjugált anti-egér IgG	

5. A metszetek kiértékelése

A metszeteket fény-, lumineszcencia- illetve konfokális pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk és az ezekhez kapcsolt kamera segítségével digitális felvételeket készítettünk. A digitális képek feldolgozását Adobe Photoshop CS6 és ZEN lite programmal végeztem.

Eredmények

1. A felnőtt bursa immuncitokémiai jellemzése

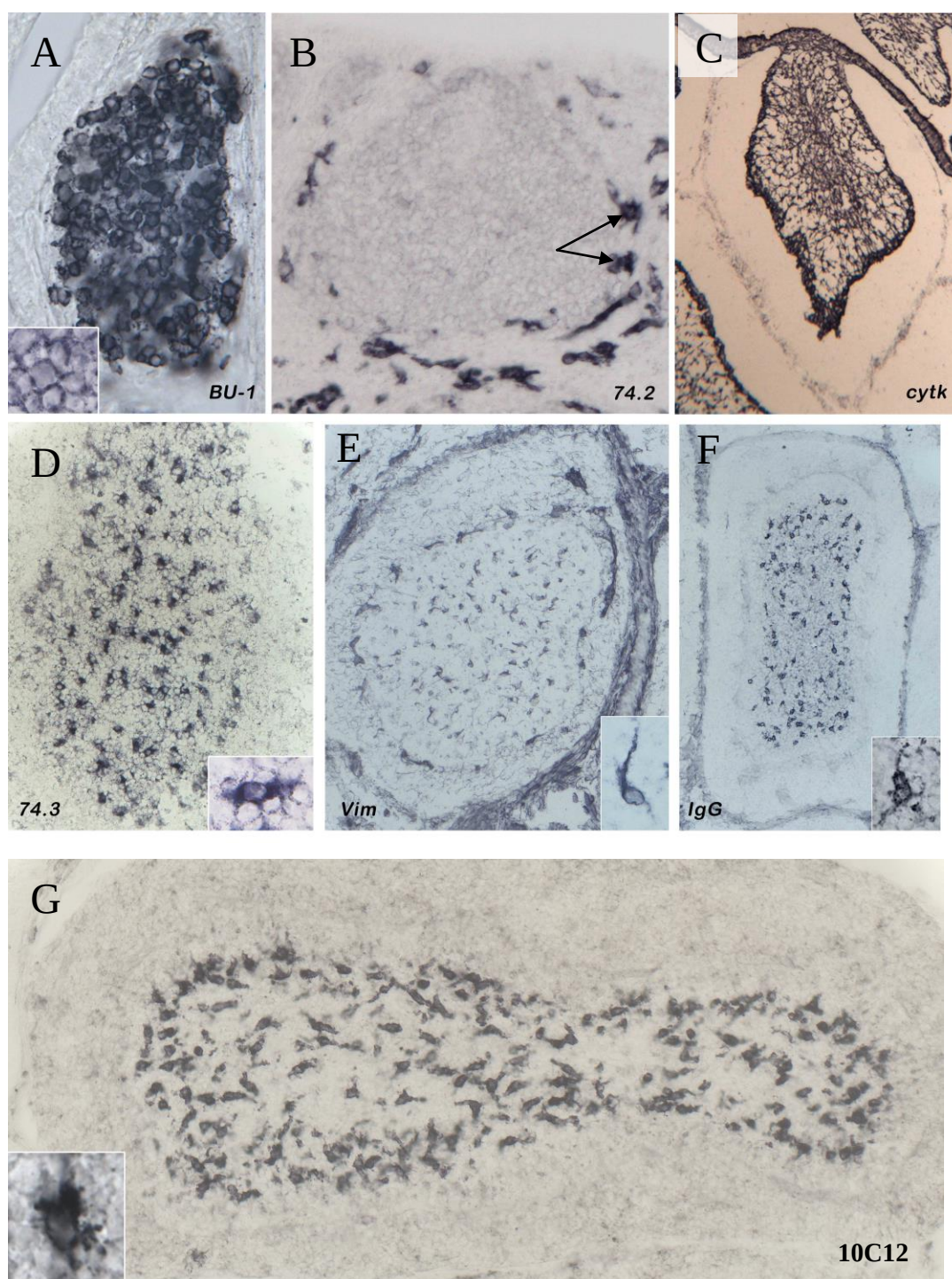
A kifejelett bursát alkotó sejtek jellemzésére különböző primer antitestekkel immuncitokémiai elemzéseket végeztünk.

A **Bu-1 antitest (chB6)** egy madár specifikus B-sejt felszíni marker, amelyet a Fejlődésbiológia Laboratóriumban állítottak elő (2A. ábra). Ez a marker egy apoptotikus folyamatokban szerepet játszó antigént jelöl (Igyártó *et al.* 2008). A Bu-1 jelölés kirajzolja a B-limfocitákkal tömött bursai follikulusokat. A **CVI-ChNL-74.2** nevű antitest madárra specifikus makrofág marker (Jeurissen, Claassen & Janse 1992). A bursai follikulusokban a medulla makrofágjait nem jelöli, csak a cortexben találhatóak elszórtan 74.2^+ sejtek (2B. ábra). Az **anti-cytokeratin** hám marker, amely kirajzolja a medulla vázát képező retikuláris epitéliumot (Viamontes *et al.* 1989), azonban nem jelöli a cortex kötőszövetes vázát (2C. ábra).

A csirke dendritikus sejtekre számos marker létezik, a legelterjedtebbek: anti-vimentin, 74.3, IgG.

A **vimentin** intermediér filamentumot (IF) felismerő antitest (**3B4**) volt az első BSDC sejtmarker (2D. ábra). A vimentin IF dendritikus sejteken kívül előfordul a kötőszöveti sejtekben is, ezért nem tekinthető specifikusnak (Olah, Kendall & Glick 1992). Csirke specifikus a **CVIChNL-74.3** antitest, ami az előzővel egy időben jelent meg és citoplazmatikus granulumokat jelöl (Jeurissen *et al.* 1992). Kettős festéssel kimutatható, hogy a 74.3 mAb illetve az anti-vimentin mAb kolokalizál (Oláh & Nagy 2013). A 74.3 antitest hátránya, hogy gyakran festi a limfociták körüli teret is (háttérrel), ezért nem megfelelő a dendritikus sejtek pontos elkülönítésére (2E. ábra). **IgG (IgY)** antitest is alkalmazható a dendritikus sejtek jelölésére (2F. ábra). A BSDC nem termel IgG-t, azonban megköti ezt felszínén. Hátránya azonban, hogy csak kikelés után alkalmazható és a laza IgG kötődés miatt immunológiai és embriológiai vizsgálatokra nem alkalmas (Oláh & Nagy 2013).

A **10C12** monoklonális antitest (mAb) által felismert molekula expresszióját először felnőtt csirke bursában vizsgáltuk, majd összehasonlítottuk a 10C12 mAb festési mintázatát a gyakran alkalmazott csirke dendritikus sejtmarkerekkel. Vizsgálatunk során azt tapasztaltuk, hogy a 10C12 mAb nagyon szelektíven jelölt nyúlványos sejteket a bursa velőállományában, hasonló mintázattal, mint az előbb ismertetett dendritikus sejtmarkerek (2G. ábra). Más madárfajokból származó bursából készült metszeteken nem tapasztaltunk 10C12 pozitivitást.



2. ábra: A felnőtt bursa immuncitokémiai jellemzése. (A) Bu-1 festés a B-sejtek jelölésére. **(B)** 74.2 festés a makrofágok jelölésére, a medulla makrofágjait nem jelöli ez a marker, csak a cortexben látható pár makrofág (nyíllal jelölve). **(C)** Cytokeratin festés, mely kirajzolja a medulla alapvázát. **(D–G)** A dendritikus sejtek jelölése különböző markerekkel. **(D)** 74.3 marker, amely egy citoplazmatikus granulumot jelöl a dendritikus sejtekben. **(E)** Vimentin intermedier filamentum jelölése, amely a dendritikus sejteken kívül a kötőszövetek sejtjeiben is előfordul. **(F)** IgG antitest, amely a dendritikus sejtek felszínéhez kötődik, így alkalmas e sejtek jelölésére. 10C12 marker, amely szintén dendritikus sejteket jelöl.

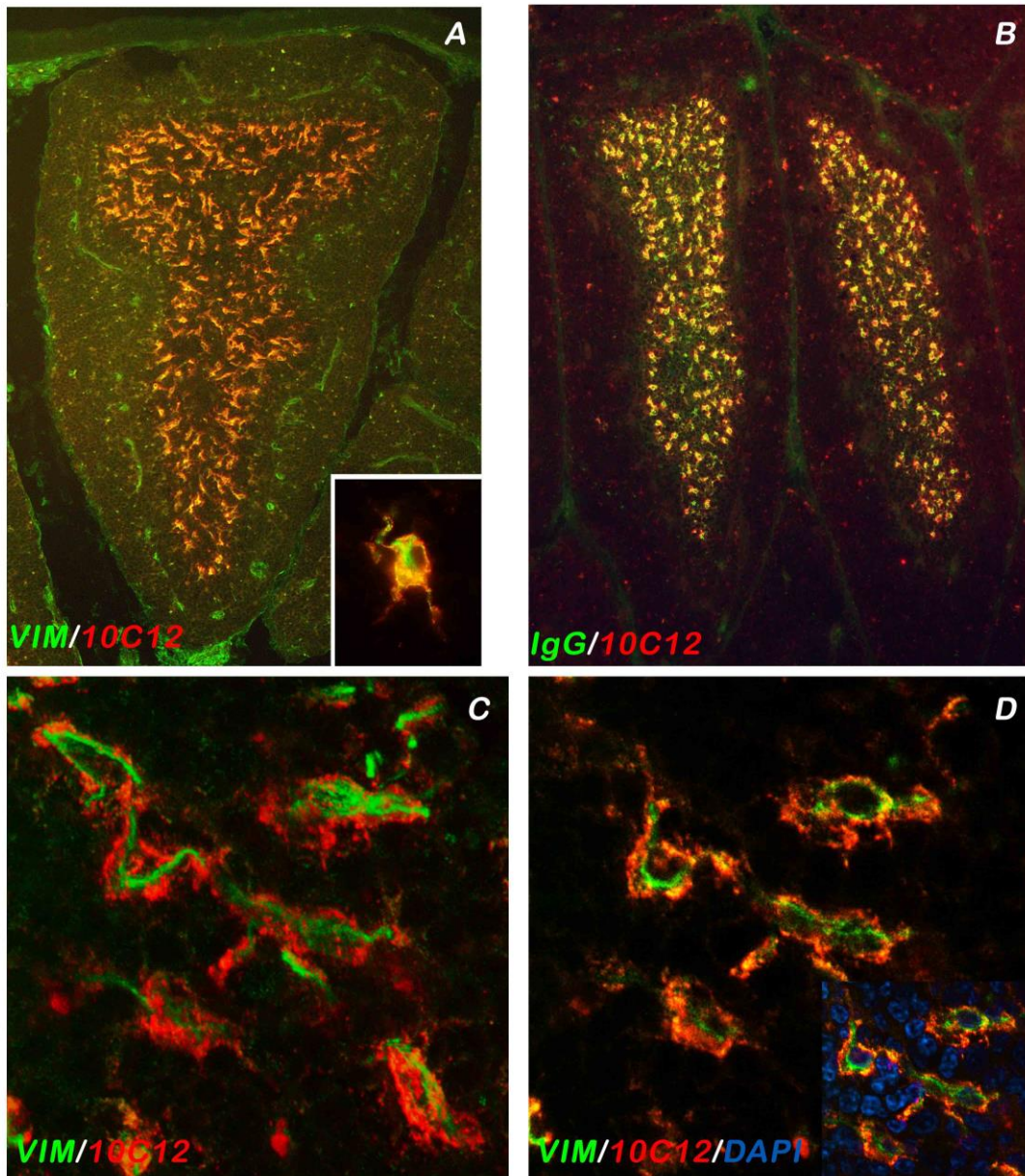
2. A felnőtt bursa immunfluoreszcens festése

Annak érdekében, hogy igazoljuk, hogy az előbbi dendritikus sejtmarkerek valóban kolokalizálnak a 10C12 mAb-el, kettős immunfluoreszcens festést végeztünk. A vimentin és 10C12 antitesttel való kettős festés során tapasztalt narancssárga színárnyalat egyértelmű kolokalizációra utalt (3A. ábra). A 10C12 mAb azonban csak a dendritikus sejteket jelölte, így sokkal specifikusabb a vimentinnél, amely jól láthatóan ott van a bursa folliculusok kötőszövetes kéregállományában is. A kettős festést IgG és 10C12 antitestekkel is elvégeztük és szintén kolokalizációt találtunk (3B. ábra). Ebben az esetben mindkét marker csak a BSDC-en volt jelen. Mivel a festési mintázat nagyon hasonlított a két markernél, szükség volt az embrionális minták elemzésére is, annak kizárására, hogy a 10C12 mAb egy IgG specifikus marker.

3. Konfokális pásztázó mikroszkópia felnőtt bursán

Ahhoz, hogy a sejt szintjén még pontosabban lokalizáljuk a 10C12 mAb által felismert antigént, a kettős immunfluoreszcens festésű metszeteket konfokális pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. Ennek előnye, hogy nagy pontossággal elkülöníthetők a sejtek egymástól.

A kinagyított dendritikus sejteken a markerek szembetűnő kolokalizációja figyelhető meg, a vimentin, mint intermediér filamentum a citoplazmában helyezkedik el, a sejtmagot körbevéve, ezzel szemben a 10C12 antigén inkább dendritikus sejtek membránja körül koncentrálódik (3C–D. ábra). A citoplazmában tapasztalt szemcsés 10C12 pozitivitás arra utalhat, hogy a marker jelöli a 10C12 antigén sejtben képződő alakját is.



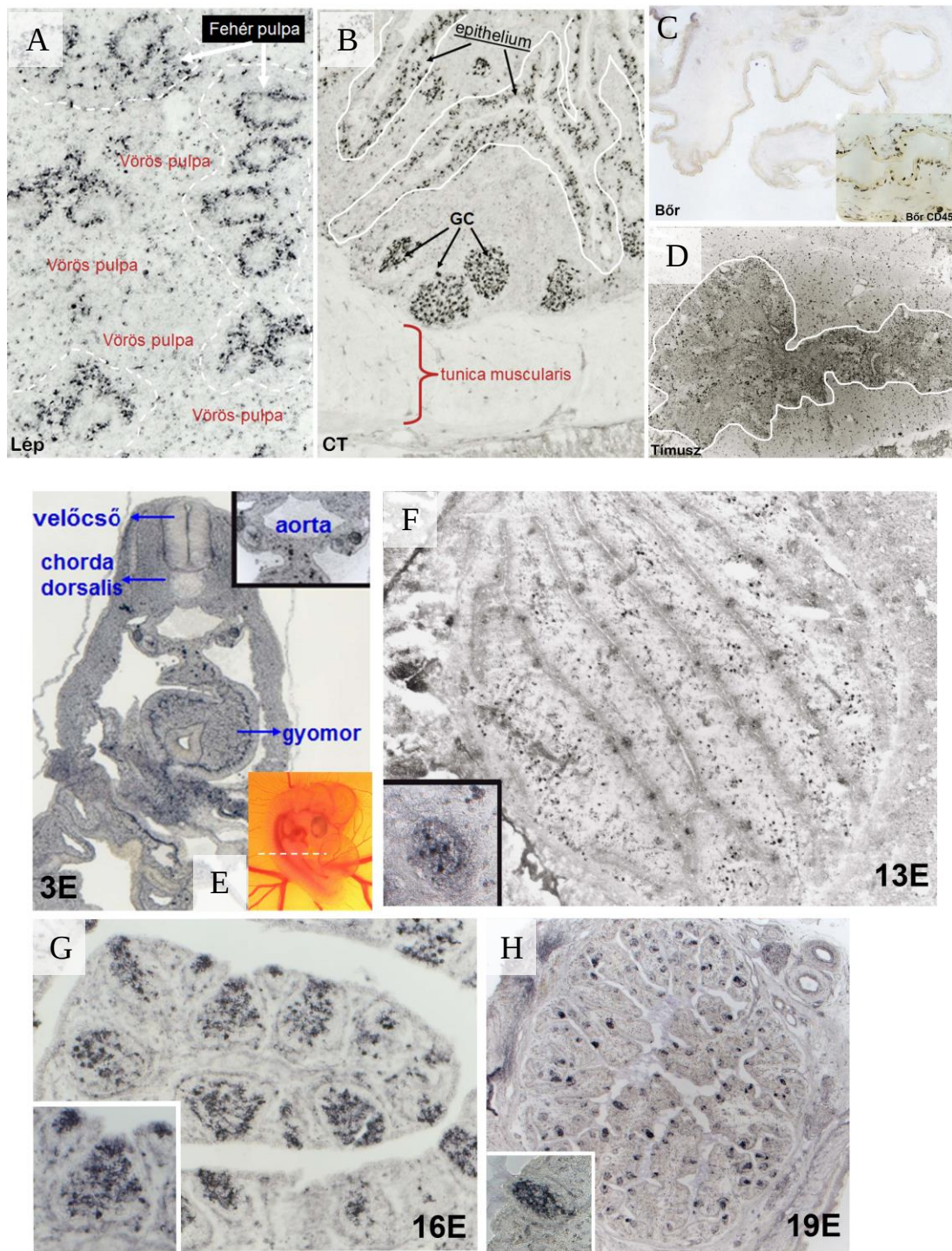
3. ábra: A felnőtt bursa immunfluoreszcens jellemzése. (A) Kettős immunfluoreszcens festés (Vimentin+10C12) bursai follikuluson. A vimentin (zöld) dendritikus és kötőszöveti sejteket, míg a 10C12 mAb (vörös), dendritikus sejteket jelöl, a narancssárgás színárnyalat kolokalizációra utal. **(B)** IgG (zöld) és 10C12 (vörös) kettős immunfluoreszcens festés bursai follikulusokon, amely szintén kolokalizációt mutat a két marker között. **(C–D) Konfokális mikroszkópia** vimentin (zöld), 10C12 (vörös) kettős festésű metszeteken. Látható, hogy a 10C12 a sejtmembrán közelében, míg a vimentin a citoplazmában a sejtmag körül lokalizálódik. A sejtmagok DAPI-val (kék) vannak megjelölve.

4. A 10C12 antigén kifejeződése egyéb nyirokszervekben

A 10C12 antigén bursán kívüli nyirokszervekben is előfordul. Így például, a 10C12 mAb jelöli a **lép** fehér pulpájának ellipszoid-asszociált sejtrétegét (4A. ábra). Ezekről a sejtekről igazolták, hogy a dendritikus sejtek előalakjai (Gallego *et al.* 1997). A 10C12 antigén megtalálható a **coecalis tonsilla** csíracentrumaiban levő follikuláris dendritikus sejtekben is, illetve a bélhám alatti sejtrétegben is (4B. ábra). Ez utóbbi sejtek típusa nem ismert, de vimentin pozitivitást mutatnak (Olah & Glick 1995) és feltehetően dendritikus sejt prekurzorok lehetnek, amelyek antitest mintát vesznek a bél lumenjéből. A madarak **bőr**ében is megtalálhatóak a dendritikus sejtekkel rokon Langerhans-sejtek (Carrillo-Farga *et al.* 1991). Ezek a sejtek CD45 pozitivitással rendelkeznek (Igyártó *et al.* 2006), de a 10C12 antitest nem jelöli őket (4C. ábra). A másik primer nyirokszervben, a **tímuszban** a 10C12 mAb nem működik megfelelően, csak elszórtan jelöl nyúlványos sejteket (4D. ábra).

5. A 10C12 antigén kifejeződése az embrionális fejlődés során

A kutatás során 3, 13, 16 és 19 napos embriók szerveit vizsgáltuk a 10C12 marker segítségével. Ellentétben az IgG dendritikus sejtmarkerrel, embrionális állapotban is találtunk 10C12 pozitivitást. A **3 napos embrió** keresztmetszetén (4E. ábra) a 10C12 mAb nyúlványos sejteket jelölt az aorta körüli mezenchimában, ami egyben a vérképző őssejtek fejlődésének helye is (Godin & Cumano 2005). A **13 napos embrió** bursájában (4F. ábra) már megindul a follikulusok képződése (Oláh, Glick & Törő 1986). Ezekben a follikulusbimbókban már látható pár 10C12⁺ sejtek. A **16 napos embrió** bursájában a 10C12 pozitív sejtek száma már sokkal több (4G. ábra), a **19 napos embrió** esetében pedig a 10C12 mAb festési mintázata, nagyon hasonlít a kifejlett bursán tapasztaltnak (4H. ábra). A kikelés előtti állapotban levő follikulusokból egyedül a cortex hiányzik, ez csak kikelés után alakul ki (Oláh *et al.* 2014).



4. ábra: A 10C12 antigén kifejeződése egyéb nyirokszerveken illetve embrionális korban. A 10C12 mAb jelöli (A) a lép fehér pulpájának ellipszoid-asszociált sejtrétegeit, (B) a coecalis tonsilla csíracetrumainak folliculáris dendritikus sejtjeit, illetve a bélhám alatti sejtrétegeket. (C) A bőrben a 10C12 mAb nem jelöli CD45⁺ Langerhans-sejteket, valamint (D) a tímuszban sem működik jól ez a marker, csak elszórtan fest nyúlványos sejteket.

A 10C12 antigén az embrionális fejlődés során (E) a 3 napos embrióban az aorta körüli mezenchimában van jelen. (F) 13 napos embrió bursájában már látható pár 10C12⁺ nyúlványos sejt, (G) 16 napos embrió esetén a 10C12⁺ sejtek száma egyre nő, (H) a 19 napos kikelés előtti állapot festési mintázata a felnőttéhez hasonló, csak a cortex hiányzik, ami kikelés után alakul ki teljesen.

Következtetés

Embrionális és felnőtt nyirokszerveken végzett immuncitokémiai festésekkel igazoltuk, hogy a 10C12 monoklonális antitest egy új, dendritikus sejtekre specifikus marker. Az ellenanyag nem keresztreagál fűrjben, gyöngytyúkban, fogolyban és kacsában sem, így kiváló eszközt jelent olyan embriómanipulációs kísérletekben (csirke-fűrj kiméra, parabiózis), amelyek célja, a dendritikus sejtek vándorlásának, differenciálódásának és szöveten belüli eloszlásának nyomonkövetése, karakterizálása. A sejten belüli lokalizációt tekintve, a 10C12⁺ antigén a csirke dendritikus sejtek membránja körül koncentrálnak és jelen van a follikulusok embrionális kialakulásától egészen felnőtt korig. Mindezek alapján alkalmas embriológiai vizsgálatokban a dendritikus sejtek nyomonkövetésére, a sejtek izolálására. A pontosabb lokalizáció meghatározására immunelektronmikroszkópiát tervezünk.

Embrionális anyagon végzett festések alapján a 10C12 mAb a bursa Fabricii fejlődése során olyan nyúlványos sejteket jelöl, amelyek hámba vándorlását a follikulusok kialakulása követi. A korai 10C12 pozitív sejtpopulációból a follikulusok fejlődésének kezdetén dendritikus sejtei (BSDC) differenciálódnak. A 10C12 pozitivitás először a 11-13. embrionális napon figyelhető meg a bursa Fabricii fejlődésekor. Ez az időpont megegyezik a 74.3⁺ sejtek első megjelenésével (Nagy & Oláh 2010). Az IgG csak kikelés után mutatható ki, míg a vimentin minden mezenchimális elemet jelöl. Mindezek azt mutatják, hogy a 10C12 mAb a dendritikus sejtek prekursorait is jelölő marker.

A 10C12 antitest egy jelenleg ismeretlen természetű molekulát jelöl, amely a BSDC-k mellett, a szekunder nyirokszervek follikuláris dendritikus sejtjeinek (FDC) membránjában is kifejeződik. A 10C12 antigén biokémiai tulajdonságainak meghatározására (molekula tömeg) Western-blott technikát fogunk alkalmazni. Mindezek alapján elmondható, hogy a 10C12 antitest alkalmas eszköz a csirke dendritikus sejtjeinek tanulmányozására.

Bibliografía

- Carrillo-Farga, J., Pérez Torres, a, Castell Rodríguez, a & Antuna Bizarro, S. (1991) Adenosine triphosphatase-positive Langerhans-like cells in the epidermis of the chicken (*Gallus gallus*). *Journal of anatomy*, **176**, 1–8.
- Ciriaco, E., Píñera, P.P., Díaz-Esnal, B. & Laurà, R. (2003) Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Microscopy research and technique*, **62**, 482–7.
- Gallego, M., del Cacho, E., Lopez-Bernad, F. & Bascuas, J. a. (1997) Identification of avian dendritic cells in the spleen using a monoclonal antibody specific for chicken follicular dendritic cells. *The Anatomical record*, **249**, 81–5.
- Glick, B., Chang, T. & Jaap, R. (1956) The bursa of Fabricius and antibody production. *Poultry Science*, **35**, 224–225.
- Godin, I. & Cumano, A. (2005) Of birds and mice: hematopoietic stem cell development. *The International journal of developmental biology*, **49**, 251–7.
- Igyártó, B.-Z., Lackó, E., Oláh, I. & Magyar, A. (2006) Characterization of chicken epidermal dendritic cells. *Immunology*, **119**, 278–88.
- Igyártó, B.Z., Nagy, N., Magyar, a & Oláh, I. (2008) Identification of the avian B-cell-specific Bu-1 alloantigen by a novel monoclonal antibody. *Poultry science*, **87**, 351–5.
- Jeurissen, S.H., Claassen, E. & Janse, E.M. (1992) Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. *Immunology*, **77**, 75–80.
- Nagy, N. & Oláh, I. (2010) Experimental evidence for the ectodermal origin of the epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius. *Development*, **137**, 3019–23.
- Olah, I. & Glick, B. (1978) Secretory cell in the medulla of the bursa of Fabricius. *Experientia*, **34**, 1642–1643.
- Olah, I. & Glick, B. (1987) Bursal secretory cells: an electron microscope study. *The Anatomical record*, **219**, 268–74.
- Olah, I. & Glick, B. (1992) Follicle-associated epithelium and medullary epithelial tissue of the bursa of Fabricius are two different compartments. *The Anatomical Record*, **233**, 577–587.
- Olah, I. & Glick, B. (1995) Dendritic cells in the bursal follicles and germinal centers of the chicken's caecal tonsil express vimentin but not desmin. *The Anatomical Record*, **389**, 384–389.
- Oláh, I., Glick, B. & Törö, I. (1986) Bursal development in normal and testosterone-treated chick embryos. *Poultry science*, **65**, 574–588.
- Olah, I., Kendall, C. & Glick, B. (1992) Differentiation of bursal secretory-dendritic cells studied with anti-vimentin monoclonal antibody. *The Anatomical record*, **233**, 111–20.
- Oláh, I. & Nagy, N. (2013) Retrospection to discovery of bursal function and recognition of avian dendritic cells; Past and present. *Developmental and Comparative Immunology*, **41**, 310–315.
- Oláh, I., Nagy, N. & Vervelde, L. (2014) Chapter 2 - Structure of the Avian Lymphoid System. *Avian Immunology (Second Edition)*, Second Edi (eds K.A. Schat, B. Kaspers & P. Kaiser), pp. 15–22. Academic Press, Boston.
- Ribatti, D., Crivellato, E. & 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**, 1–4.

- Rottach, E. (2012) *Generierung Und Charakterisierung Neuer Marker Für Hühner B-Zellen*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Taylor, R.L. & McCorkle, F.M. (2009) A landmark contribution to poultry science--Immunological function of the bursa of Fabricius. *Poultry science*, **88**, 816–23.
- Viamontes, G.I., Audhya, T.K., Babu, U. & Goldstein, G. (1989) Immunohistochemical localization of bursin in epithelial cells of the avian bursa of Fabricius. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **37**, 793–799.