

# A bursa Fabricii corticalis B lymphocytáinak ontogenezise és karakterizálása új monoklonális ellenanyagokkal

Doktori tézisek

**Pecsenye-Fejszák Nóra Florina**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Nagy Nándor DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Tőkés Anna-Mária, PhD, tudományos főmunkatárs  
Dr. habil. Heinzlmann Andrea, PhD, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Buzás Edit, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Jakus Zoltán Péter, PhD, egyetemi docens  
Dr. Gócza Elen, DSc, tudományos tanácsadó

Budapest  
2023

# 1. Bevezetés

A gerincesek adaptív immunitása az egyed egész életében folyamatosan fejlődik, alkalmazkodik az újabb vagy módosult kórokozókhoz, elősegítve a szervezet hatékony védekezését a megváltozott környezethez. Az elmúlt évtizedekben robbanásszerűen fejlődő immunológiai kutatások széleskörben tárták fel immunrendszerünk működésének sejtes és molekuláris alapjait.

Az általánosságban használt kísérletes immunológiai állatmodellek (egér, patkány) mellett, a madarak is az immunológiai és a fejlődésbiológiai kutatások elterjedt modell szervezetévé váltak, ugyanis a tojásban fejlődő embriók könnyebb hozzáférhetősége széleskörű lehetőséget nyújt az embriómanipulációs technikák megvalósítására. Továbbá, az emlősöktől eltérően a madarak lymphocytáinak differenciálódása a thymus mellett nem a csontvelőben, hanem egy bélhez asszociált, specifikus nyirokszervben a bursa Fabricii-ben zajlik. A morfológiai megfigyelés mellett, embriómanipulációs technikákat is alkalmazó kutatások csirkében igazolták elsőként, hogy csak a „bursa eredetű lymphocyták” (B lymphocyták) képesek antigén specifikus ellenanyagok termelésére, ami megalapozta az immunitás disszociációs elméletének megszületését, miszerint a sejtközvetített immunválaszt a T lymphocyták, az ellenanyag közvetítette immunválaszt pedig a B lymphocyták végzik. Fontos kiemelni, hogy a bursa Fabricii a madarak olyan primer lympho-myeloid szerve, ahol a B lymphocyták differenciálódása és érése más lymphoid, myeloid és erythroid sejtvonalak fejlődésétől függetlenül történik. Ezáltal a bursa Fabricii alkalmas kísérleti modell azon molekuláris mechanizmusoknak a feltárására, amelyek specifikusan a B lymphocyták ontogenezisét befolyásoló szöveti környezetet jellemzik.

A lymphocyták fejlődését irányító mikrokörnyezet és a lymphoid sejtek karakterizálását célzó alapkutatások rutinszerűen használt eszközei a monoklonális ellenanyagok, amelyek alkalmasak egy adott sejtípus azonosítására és szöveten belüli lokalizációjának meghatározására. A hematológiai betegségek nagy száma és változatossága miatt, egyre nagyobb az igény a hematopoiitikus sejteket specifikusan felismerő monoklonális ellenanyagokra, amelyek hasznos eszközök lehetnek a vérképzés és a lympho-myeloid sejtek differenciálódásának nyomon követésére, elősegítve a humán gyógyászatban alkalmazható célzott terápiás kezelések kifejlesztését.

A lymphocyták fejlődését irányító mikrokörnyezet és a lymphoid sejtek karakterizálását laboratóriumunkban készült nagyszámú monoklonális ellenanyag alkalmazásával közelítettük meg. A lymphoid sejteket jelölő ellenanyagok közül a 7H3 elnevezésű klón immunhisztokémiai festési mintázata teljesen eltért az eddig ismert antitestekétől és előzetes eredményeink alapján feltételezzük, hogy bursai B lymphocyták egy alpopulációját jelöli. *In vitro* és korábbi áramlási citometriás kísérletek szerint a bursa Fabricii-n belül eltérő B lymphocyta populációk azonosíthatók, viszont ezek szöveti környezetben való elhelyezkedése, pontos immunfenotípusa, fejlődése és funkciója nem ismert.

## 2. Célkitűzések

A házasított madarak az immunológiai és fejlődésbiológiai kutatások gyakran használt kísérletes modell szervezetei. A lymphocyták fejlődését irányító mikrokörnyezet karakterizálását és a lymphoid sejtek ontogenezisének követését laboratóriumunkban hybridoma technikával készült, nagyszámú csirke és gyöngytyúk specifikus monoklonális ellenanyag alkalmazásával közelítettük meg. Kísérletes munkám első felében a 7H3 elnevezésű egér monoklonális ellenanyag immunhisztokémiai és biokémiai karakterizálását végeztem, amely előzetes vizsgálataink alapján a felnőtt gyöngytyúk bursa Fabricii-ben az eddig ismert B lymphocyta markerektől eltérően, csak a B lymphocyták egy alcsoportját jelölte.

Kísérletes munkám második felében, együttműködésben a müncheni Ludwig-Maximilians Universität Állatorvosi Karának, Komparatív Immunológiai kutatócsoportjával a lymphoid sejtek migrációjában szerepet játszó CXCR4 receptor és kemokin ligandja, a CXCL12 expressziós mintázatának változását követtem a madarak B lymphocytáinak fejlődése során.

### **Kutatásom céljai a következők voltak:**

1. A 7H3+ sejtek eloszlásának vizsgálata a felnőtt gyöngytyúk nyirokszerveiben.
2. A 7H3+ sejtek megjelenésének a leírása az embrionális fejlődés során.
3. A 7H3 antigén molekula tömegének és sejten belüli lokalizációjának meghatározása.
4. A CXCR4 receptor expressziós mintázatának vizsgálata felnőtt gyöngytyúk és csirke bursa Fabricii-ében.
5. A CXCR4 receptor és a 7H3 antigén expressziós mintázatának összehasonlítása a bursa Fabricii B lymphocytáin.
6. 7H3 antigén sejtmigrációban betöltött szerepének vizsgálata *in vitro* és *in vivo* módszerek alkalmazásával.

## **3. Módszerek**

### **3.1. Kísérleti állatok**

Kísérleteinkhez gyöngytyúk (*Numida meleagris*) és csirke (*Gallus gallus domesticus*) embriókat, illetve kikelt állatok szerveit használtuk fel. A gyöngytyúk tenyész tojásokat a gödöllői Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ, Haszonállat-génmegőrzési Intézetének Génmegőrzéstudományi - és Kisállattenyésztési Osztálya biztosította számunkra. White Leghorn fajtájú, SPF (Specific-pathogen-free) csirke tojásokat kereskedelmi tenyésztőtől (Prophyl Kft.) szereztük be. Embrionális szövetmintákat a második embrionális naptól (E), egészen a kikelés előtti napokig (gyöngytyúk E25, csirke E20) vettünk ki. A tojásokat laboratóriumunk saját keltetőgépében forgatórácon 37°C-on, 60%-os páratartalom mellett inkubáltuk. A kikelést követően felnőtt állatokból (4-10 hetes kor között) bursa Fabricii, thymus, lép, coecalis tonsilla és vér szövetmintákat vettünk, korcsoportonként legalább 3 állatból.

### **3.2. Minták szövettani feldolgozása**

Kriotómos metszéshez, az izolált szerveket zselatinos fagyasztott blokkokba ágyasztuk. Első lépésként mintáinkat 1 órán keresztül fixáltuk pufferelt 4%-os paraformaldehidben (PFA), majd foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) mostuk (3x5 perc). A fixálást követően, a szerveket egy éjszakán át PBS alapú 15%-os szacharóz oldatban, 4°C-on inkubáltuk, majd a beágyazást megelőzően 37°C-on, 1 órán keresztül, 15% szacharózt és 7,5% zselatint tartalmazó PBS elegyében inkubáltuk. A blokkokat folyékony nitrogénnel -50°C-ra hűtött 2-metilbutánban (Sigma) fagyasztottuk le. A blokkokból 10-12 µm-es metszeteket készítettünk, amelyeket poly-L-lysine-el bevont lemezekre vettünk fel. Vérkenet készítéshez, a vérmintát 10 IU/ml koncentrációjú heparint tartalmazó steril fecskendőbe gyűjtöttük. A levegőn szárított vérkeneteket metanolban fixáltuk 10 percre, majd -20°C-on tartottuk felhasználásig.

### **3.3. 7H3 monoklonális ellenanyag készítése**

A 7H3 elnevezésű, gyöngytyúk specifikus monoklonális ellenanyag laboratóriumunkban hybridoma technikával készült, amely során Balb/c egereket immunizáltunk 8 hetes gyöngytyúk bursa Fabricii-ből származó sejtszuspenziójával. Az

immunizált egerek lépéből kinyert B sejteket Sp2/0-Ag14 egér myeloma sejtekkel fuzionáltattuk. A hybridoma felülűszók tesztelése 3-5 hetes gyöngytyúk nyirokszerveiből származó szövettani mintákon történt. A hybridoma felülűszó immunhisztokémiai és Western blott analízisének megkezdése előtt, a kiválasztott hybridomák visszaklónozása legalább kétszer megtörtént. A monoklonális ellenanyag izotípusának meghatározása ELISA kit alkalmazásával végeztük. A monoklonális ellenanyag tisztítása a 7H3-as hybridoma sejttenyészet felülűszójából, izotípus specifikus Protein G Agarose oszlop (Nab protein G Spin Kit, Thermo Scientific) felhasználásával történt. A megtisztított 7H3 monoklonális ellenanyag koncentrációját spektrofotometriás méréssel állapítottuk meg.

### **3.4. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia, metszetek fényképezése, feldolgozása**

A fagyasztott metszeteket primer ellenanyaggal 45 percig szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltuk. Szekunder ellenanyagként biotinnal konjugált, lóban termelt anti-egér IgG-t vagy kecskében termelt anti-nyúl IgG-t használtunk, amellyel a metszeteket nedves kamrában további 45 percig inkubáltuk. A szöveti endogén peroxidáz aktivitásának blokkolására PBS-el 3%-ra hígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ba helyeztük a metszeteket 10 percre. A PBS-es mosást követően avidin-biotin-peroxidáz komplexet (ABC) vittünk fel a metszetekre (30 perc). A bekötődött peroxidáz enzim aktivitását 4-chloro-1-naphthollal detektáltuk. Immunfluoreszcens festések esetében a metszetek előkészítését és primer ellenanyaggal való inkubálását az előbbieken leírtakkal azonos módon végeztük. Ezt követően fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyagot (kecskében termeltetett anti-egér IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> és anti-nyúl IgG) mértünk a metszetekre, amelyeket 45 percig nedves kamrában inkubáltuk. A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6 diamino-2-phenylindole, dihydrochloride) reagenst használtunk. Az immunjelölések kiértékelése fény-, fluoreszcens (Nikon Eclipse E800), konfokális pásztázó (Zeiss LSM 780) és STED (Abberior Expert Line- Nikon Ti2) mikroszkópokkal történt. A digitális kamerával készített képek feldolgozását ImageJ, illetve Adobe Photoshop programok segítségével végeztük.

### **3.5. SDS gélelektroforézis és Western blot**

A 7H3 monoklonális ellenanyag által jelölt antigén molekulatömegét gélelektroforézis és Western blot segítségével határoztuk meg, 6 hetes gyöngytyúk bursa

Fabricii és thymus lebenyeiből készült sejtszuspenzióból. A fehérvérsejteket tartalmazó sejtszuspenziót Whatman kvalitatív szűrőpapír (10 µm pórusméret, MilliporeSigma) használata mellett készítettük, majd centrifugálást (4°C, 520 g 25 perc) követően a sejtekhez lízis puffert mértünk (150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 1% Triton X-100, 0,1% SDS és proteáz inhibitor), amit jégen egy órát állni hagytunk. Centrifugálást követően (4°C, 21000 g, 10 perc) a felülúszót felhasználásig -20 C-on tároltuk. A Western blot vizsgálat megkezdése előtt a sejtlyázatokhoz redukáló Tris-SDS puffert (0,5M TRIS pH: 6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 0.5% mercaptoethanol és 0,00125% bromophenol kék) adtunk és 4 percen át forraltuk. Ezt követően a redukált mintáink fehérjéit elektroforézis útján választottuk el egymástól (12%-os poliakrilamid gél, 200 V, 50 perc), majd a szétvált fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk (1 óra, 100 V). A sikeresen szétvált fehérjék kimutatására indirekt immunhisztokémiai jelölést alkalmaztunk. Elsőként 7H3 monoklonális ellenanyaggal 2 órát inkubáltuk, majd szekunder ellenanyagként tormaperoxidázzal kapcsolt ellenanyagot (kecskében termeltetett, anti-egér IgG-HRP; Vector Laboratories) használtunk. A membránok mosására minden lépés között, 3%-os zsírtalan tejpor tartalmú PBS-Tween-t használtunk. Az immunreakciót kemilumineszcens reagenssel (Luminata Classico Western HRP substrate, Millipore) röntgenfilmre hívtuk elő.

### **3.6. Szikhólyag *in ovo* tenyésztése**

A 7H3+ sejtek extraembrionális eredetének bizonyítására egy új technikát, a szikhólyag *in ovo* tenyésztését alkalmaztuk. Ennek során, még keringéssel nem rendelkező, HH10-es stádiumú gyöngytyúk embriókat Moria Pascheff-Wolff rugós olló segítségével eltávolítottuk az embriópajzs közepéről. Az így létrejött embrió nélküli szikhólyag tenyészeteket további két napig inkubáltuk, 37°C -os keltetőben. Az inkubációs idő leteltével a tenyésztett szikhólyagot 1x1 cm-es darabokra vágva 4%-os PFA-ban fixáltuk és zselatinba ágyasztuk.

### **3.7. Antitest-antigén kapcsolódásán alapuló funkció blokkoló vizsgálat**

A 7H3 antigén funkciójának vizsgálatához antigén-antitest kapcsolódásán alapuló funkció blokkoló eljárást kombináltunk chorioallantois membrán (CAM) transzplantációs technikával. A kísérlethez 9 napos csirke, embrionális bursa kezdeményeit izoláltuk. A transzplantáció előtt az izolált bursa Fabricii-eket 0,2µl,

100 µg/ml koncentrációjú, komplett RPMI-1640 médiumhoz adott, 7H3 ellenanyaggal (n=8) injektáltuk, amelyhez 0,1%-os FastGreen oldatot is adtunk. A FastGreen-nel és komplett médiummal injektált kontroll bursa Fabricii-k (n=6) mellett, egy 100 µg/ml koncentrációjú anti-N-cadherin ellenanyaggal (DSHB, klón 6B3) kezelt negatív kontroll csoportot is alkalmaztunk (n=7). Az injektált bursa Fabricii kezdeményeket egyesével 9 napos (fogadó) csirke embrió CAM-ra transzplantáltuk és további 7 napig keltetőgépben inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a CAM graftokat 4%-os PFA-ban fixáltuk és zselatinba ágyasztuk.

### **3.8. *In vitro* B lymphocytá sejt migrációs teszt**

Az embrionális B lymphocyták vándorlását 13 napos csirke embrió, bursa Fabricii redőinek tenyészetén vizsgáltuk. A kipreparált redőket fibronectinnel előkezelt Petri-csészékbe (20µg/ml Penicillin/Streptomycin tartalmú DMEM-ben hígítva) helyeztük és a médiumot a vizsgálati csoportoknak megfelelő oldatokra cseréltük. Így a pozitív kontroll csoport esetében (n=6) komplett RPMI-1640-es médiumhoz CXCL12 kemoattraktáns (100ng/ml) adtunk, a további két negatív kontroll csoport esetében, pedig vagy adalék anyag mentes, komplett RPMI-1640-es médiumot (n=4), vagy a komplett médiumhoz adott CXCL12 (100ng/ml) és anti-N-cadherin ellenanyagot (9ng/ml) együttesen (n=6) alkalmaztunk. A kísérleti csoport (n=7) esetében a komplett médium hozzáadott CXCL12-t (100ng/ml) és tisztított 7H3 ellenanyag (9ng/ml) tartalmazott. A bursa redő tenyészeteket az inkubálást követően (24 óra, széndioxid termosztátban) PFA-ban fixáltuk le. A sejt vándorlást ImageJ szoftver segítségével mértük, figyelembe véve a kivándorolt sejtek számát és a sejtek bursa redőktől való távolságát. Az adatok statisztikai elemzése során Kruskal-Wallis tesztet használtunk, amelyet egy post-hoc Dunn teszt követett. Az így kapott eredményeken Holm-Bonferroni-korrekción alkalmaztunk.



## 4. Eredmények

### 4.1. 7H3 ellenanyaggal jelölt sejtek eloszlásának meghatározása felnőtt gyöngytyúk nyirokszerveiben

Tudományos kutatási témám kiinduló pontját azok a laboratóriumunkban, hybridoma technikával készült, egér, monoklonális ellenanyagok adták, amelyeket kifejezetten a madarak lympho-myeloid sejtjeinek karakterizálása céljából hoztunk létre. Kísérletes munkám első részében ebből a hybridoma sorozatból egy, a bursa Fabricii lymphocytáit szelektíven felismerő, a szakirodalomból még nem ismert immunhisztokémiai mintázatot mutató, 7H3 elnevezésű monoklonális ellenanyag került kiválasztásra.

A 10 hetes gyöngytyúk bursa Fabricii folliculusainak kéregállományában a 7H3 ellenanyag elszórtaan elhelyezkedő, kerekded morfológiájú sejtekből álló, elkülönült sejtcsoportokat jelölt. A velőállomány sejtjei nem mutattak 7H3 immunpozitivitást. Kettős immunfluoreszcens festéseket követően a bursalis 7H3+ sejtek többsége a madarak B lymphocytáit általánosan jelölő chB6 ellenanyaggal mutatott kolokalizációt. A 7H3+ B lymphocyták folliculuson belüli pontos lokalizációjának meghatározására a cortico-medulláris határ mentén, valamint a kéregállományi kapillárisok körül lokalizálódó basalis membránt szelektíven jelölő, laminin immunhisztokémiai festést alkalmaztunk, amellyel igazoltuk, hogy a 7H3+ B lymphocyták kifejezetten a kéregállomány területén, a kapillárisok körül lokalizálódnak.

A bursa Fabricii-vel szemben, a 7H3 ellenanyag a thymus valamennyi kéreg- és velőállományi CD3+ T lymphocytáját jelölte, viszont a velőállományában jelen lévő chB6+ B lymphocytá populáció nem expresszálta a 7H3 antigént.

A szekunder nyirokszerveken, így a coecalis tonsillán és lépén végzett immunjelölések alapján, 7H3 pozitivitást csak a T dependens területeken tapasztaltunk. A coecalis tonsilla területén 7H3 ellenanyag a csíracentrumok körüli interfollikuláris terület CD3+ T lymphocytáit jelölte. A B dependens csíracentrumokban elszórtaan megfigyelhető néhány 7H3+ sejt szintén CD3+ fenotípust mutatott. A gyöngytyúkok lépéből készült metszeteken a 7H3 ellenanyaggal intenzív immunreakciót kaptunk a vörös pulpa és a periarteriolaris lymphoid hüvely (PALS) területén. Ez a mintázat nagyon hasonló volt az anti-CD3 ellenanyaggal kapott immunhisztokémiai jelöléshez.

A perifériás keringésben előforduló 7H3+ sejtek karakterizálása érdekében kettős immunfestéseket készítettünk vérkeneten, amely során a 7H3 ellenanyag kerekded morfológiájú, mononukleáris, CD3+ T lymphocytákat festett gyűrűszerűen. A hasonló méretű és morfológiájú chB6+ B lymphocytákat, a csoportosan megjelenő thrombocytákat, és a lebonyozott sejtmagvú granulocytákat nem jelölte a 7H3 ellenanyag.

Fürj, csirke, liba, valamint emlősök közül egér és hörcsög nyirokszervein végzett immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a 7H3 ellenanyaggal csak a csirke szövetein azonosítottunk fajok közötti kereszt-reaktivitását.

Összeségében elmondható, hogy a felnőtt gyöngytyúk és csirke nyirokszerveiben a 7H3 ellenanyag valamennyi T lymphocytára, valamint a bursai B lymphocyták egy kéregállományi, kapillárisok körül lokalizálódó alpopulációjára specifikus marker, amely kifejezetten sejtfelszíni membránjelölést ad.

#### **4.2. 7H3 pozitív sejtek megjelenése a gyöngytyúk embrionális fejlődése során**

Megvizsgáltuk a 7H3 ellenanyag által felismert antigén korai embrionális stádiumokban történő megjelenését is. Az első 7H3+ sejteket 2 napos gyöngytyúk embrió (Hamburger-Hamilton beosztás szerint 12. stádiumú embrió: HH12), szikhólyagjának vérszigeteiben azonosítottuk. Fél nappal később (HH15-ös stádium) már számos, kerekded morfológiával rendelkező, 7H3+ sejtet figyeltünk meg az extraembrionális erek lumenében, illetve szorosan az endothel sejtekhez kapcsolódva. Ezek a korai 7H3+ sejtek, a hematopoietikus sejtre specifikus QH1 monoklonális ellenanyag által jelölt  $\alpha$ -macroglobulint is koexpresszálták.

A 7H3 antigén hematopoietikus sejtekre jellemző expresszióját későbbi stádiumokban (HH19-HH25), az intraembrionális vérképző helyeken is megfigyeltük. A legtöbb gerinces faj esetén, a dorsalis aorta ventrális falában megjelenő páros intraaortikus-hematopoietikus-klaszter (IAHC) az egyik legjobban karakterizált intraembrionális vérképző hely. A definitív vérképző őssejtek forrásaként szolgáló IAHC sejtei között számos, 7H3+ sejtet azonosítottunk HH19-es stádiumú gyöngytyúk embrióban. Későbbi, HH25-ös stádiumban, az IAHC-ből a dorsalis mesenteriumba kivándorló sejtek által kialakított, úgynevezett para-aortikus régióban is számos, 7H3+ sejtet azonosítottunk.

Mivel a korai embrióban az extra-, és intraembrionális vérképző helyeken egyaránt megfigyeltünk 7H3+ sejteket, felmerült a kérdés, vajon a szikhólyagban található 7H3+ sejtek intraembrionális területről származnak vagy *in loco* differenciálódnak. Egy általunk kifejlesztett mikrosebészeti technika, a teljes embrió ablációját követő *in ovo* szikhólyag tenyésztéssel bizonyítottuk, hogy az extraembrionálisan jelen lévő 7H3+/QH1+ sejtek a szikhólyag területén keletkeznek.

A korai vérképző helyek után a 7H3 ellenanyaggal immunreakciót adó legtöbb sejtet a fejlődő, E14-es stádiumú bursa Fabricii mesenchymalis telepében azonosítottuk. Kettős immunfluoreszcens jelöléssel kimutattuk, hogy a bursa Fabricii mesenchymáját kolonizáló chB6+ B lymphocytá prekurzorok már kifejezik a 7H3 antigént. A E16-os stádiumtól kezdve a fejlődő folliculus bimbókat kitöltő, chB6+ B lymphocyták nagy része expresszálja a 7H3 antigént. A myeloid sejtvonalhoz tartozó NIC2+ szekréciós dendritikus sejtek, valamint BID3+ makrofágok nem jelölődnek a 7H3 ellenanyaggal. A kikelésig és az azt követő pár napban a hámbimbókat kitöltő B lymphocyták egyenletesen fejezik ki a 7H3 antigént. A kikelést követő második héttől, a 7H3 antigén kifejeződése fokozatos lecsengést mutat, amely először a bursai folliculusok velőállományi sejtjein jelentkezik, majd a kikelést követő 10. hétre a 7H3 pozitivitás a kéregállomány kapillárisok körüli sejtcsoportjaira korlátozódik.

A 7H3 ellenanyag korai vérképző helyeken megfigyelt festési mintázata, valamint a 7H3+ sejtek QH1 ellenanyaggal mutatott kolokalizációja alátámasztja, hogy a 7H3 ellenanyag jelöli a hematopoietikus sejteket. Megállapításunkat szintén igazolja a szikhólyag *in ovo* tenyésztése esetében, *in loco* differenciálódó 7H3+ sejtek jelenléte. Az embrionális fejlődés későbbi stádiumaiban megfigyelt eredményeink szerint a 7H3 ellenanyag szelektíven jelöli a bursa Fabricii mesenchymáját kolonizáló, majd folliculus bimbókba belépő, B lymphoid sejtvonallal irányban elköteleződött prebursalis B lymphocytákat.

#### **4.3. A 7H3 antigén molekulatömegének meghatározása**

A 7H3 antigén molekulatömegét 6 hetes gyöngytyúk bursa Fabricii és thymus lizátumból határoztuk meg gélelektroforézissel és Western blottal. Eredményeink azt mutatják, hogy redukzív körülmények között a 7H3 ellenanyag egyetlen, ~80 kDa tömegű molekulát ismer fel a thymus és bursa Fabricii lizátumaiban egyaránt.

#### **4.4. A CXCR4 receptor expressziós mintázatának összehasonlítása gyöngytyúk és csirke bursa Fabricii-ben**

Emlősökben a CXCR4 kemokin receptor és ligandja, a stromális sejtek által termelt CXCL12 (más néven: SDF-1) fontos szerepet tölt be a lymphoid sejtek migrációs folyamataiban és csontvelőn belüli homeosztázisában. Kollaborációban a müncheni Ludwig-Maximilians Universitát Állatorvosi Karának, Komparatív Immunológiai kutatócsoportjával csirke állatmodellen vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a CXCR4/CXCL12 jelátvitel a bursai B lymphocyták fejlődését.

Kísérletes munkám második részében, a kollaborátorunktól kapott új, madár specifikus, anti-CXCR4 ellenanyag immunhisztokémiai tesztelését végeztem, mind csirke, mind gyöngytyúk bursa Fabricii-ből származó mintákon. 10 hetes gyöngytyúk és 6 hetes csirke bursa folliculusok kéregállományi régiójában detektáltunk erős CXCR4 pozitívítást. Kettős immunfluoreszcens jelöléssel kimutattuk, hogy mind a gyöngytyúk, mind a csirke kéregállományi chB6+ B lymphocytái kifejezik a CXCR4 receptort, viszont a receptor kifejeződésének a mértéke eltér a kéreg különböző területein. A folliculusok kéregállományának külső régiójában lokalizálódó B lymphocytákat erős CXCR4 expresszió jellemzi (CXCR4<sup>high</sup>), míg közvetlenül a kéreg-velő határ melletti, kapillárisokat tartalmazó, belső keskeny sávban lévő chB6+ sejtek CXCR4 pozitívítása gyenge (CXCR4<sup>low</sup>) vagy teljesen hiányzik (CXCR4<sup>-</sup>).

Különböző embrionális stádiumokban kapott komparatív immunhisztokémiai eredményeink alapján azonosítottuk, hogy a csirke és gyöngytyúk bursalis B lymphocyták CXCR4 receptorának kifejeződése változik a bursa Fabricii organogenezise során. Embrionálisan valamennyi bursalis B lymphocytá CXCR4+, viszont a kikelést követően, a folliculusok kéregállományának formálódásával párhuzamosan a CXCR4 kifejeződése a kéregállományi sejteken marad fenn.

#### **4.5. A CXCR4 receptor és a 7H3 antigén expressziós mintázatának összehasonlítása a bursa Fabricii B lymphocytáin**

A gyöngytyúk fejlődő bursalis B lymphocytáinak időben változó CXCR4 pozitívítását hasonlítottuk össze a 7H3 antigén időben szintén változó kifejeződésével. Embrionálisan valamennyi bursalis 7H3+ B lymphocytá egyenletesen kifejezi a CXCR4 receptort, viszont felnőtt gyöngytyúk bursai folliculusainak 7H3+ sejtjei kifejezetten a

kéreg azon belső területén találhatóak, ahol a CXCR4- vagy CXCR4<sup>low</sup> B lymphocyták lokalizálódnak.

#### **4.6. 7H3 antigén sejtmigrációban betöltött szerepének vizsgálata *in vitro* és *in vivo* módszerek alkalmazásával**

A 7H3 ellenanyag funkció blokkoló hatásának vizsgálatára 9 napos csirke embrió (E9) chorioallantois membránjára B lymphocyták által még nem kolonizált E9 bursa telepet helyeztünk, amelynek a mesenchymájába az *in vivo* tenyésztés megkezdése előtt ismert koncentrációjú 7H3 ellenanyagot injektáltunk. Kontrollként komplett RPMI - 1640 tenyésztő médiumot, illetve a B lymphocyták által nem expresszált, neuron specifikus N-cadherin-t felismerő egér monoklonális ellenanyagot használtunk. A chorioallantois membránon történő tenyésztést követően a 7H3 ellenanyaggal kezelt bursa Fabricii folliculusainak rendellenes fejlődését figyeltük meg, amely esetben kevesebb számú, csökevényes folliculus bimbó alakult ki. A kontroll csoportoknál, így az anti-N-cadherin ellenanyaggal, illetve a komplett RPMI-1640 médiummal történő kezeléseket után a folliculusok kialakulása nem szenvedett zavart. Eredményeink alapján a 7H3 ellenanyag bekötődve saját antigénjéhez funkció blokkoló hatást ért el, megzavarva a B lymphocyták prekursorok folliculus bimbókba történő migrációját.

A 7H3 antigén sejtmigrációban betöltött szerepének további feltárása céljából *in vitro* kísérletet végeztünk, amely során 13 napos, embrionális bursa redőket fibronectinnel bevont Petri csészére helyeztünk ki, és 24 óráig komplett RPMI-1640 médiumban (n=5) inkubáltunk. Az inkubációs idő eltelte után kis mennyiségű kivándorolt sejtet detektálhattunk. Annak érdekében, hogy elősegítsük a B lymphocyták kivándorlását a bursa redőkből, a tenyészetekhez CXCL12 kemoattraktánst is adtunk. Sejtszámlálás alapján a CXCL12 molekula jelenlétében (n=6) a bursa redőkből kivándorló 7H3+/CXCR4+ sejtek száma ötszörösére növekedett a komplett RPMI-1640 médiumban tenyésztett csoportéhoz képest. Ezt követően, a CXCL12 kemokin jelenléte mellett, tisztított 7H3 ellenanyagot is adtunk a tenyészetekhez (n=6). A 7H3 ellenanyag jelenléte szignifikánsan ( $p \leq 0.001$ ) lecsökkentette a médiumba kivándorló B lymphocyták számát.

## 5. Következtetések

1. Kimutattuk, hogy a 7H3 elnevezésű egér monoklonális ellenanyag a gyöngytyúk és csirke szöveteiben lymphocytákra specifikus sejtfelszíni antigént ismer fel. Western blot analízis alapján a 7H3 ellenanyag egyetlen polipeptid láncból álló ~80 kDa molekulatömegű fehérjét (7H3 antigént) jelöl.
2. Immunhisztokémiai festésekkel igazoltuk, hogy a 7H3 antigén a szikhólyag vérképző őssejtjein jelenik meg először, majd az aorta kialakulását követően az intraembrionális vérképző helyeken lokalizálódó hematopoietikus őssejtek is expresszálják.
3. A szikhólyag *in ovo* tenyésztésével egy új embriómanipulációs technikát fejlesztettünk ki, amivel kísérletesen bizonyítottuk, hogy a legelső 7H3+ vérképző őssejtek a szikhólyag vérszigeteiben keletkeznek.
4. Igazoltuk, hogy a bursa Fabricii organogenezise során az embrionális bursa telepet kolonizáló B lymphocytá prekurzorok kifejezik a 7H3 antigént, viszont a kikelést követően az antigén expressziója lecsökken és csak a kéregállományi B lymphocyták egy alpopulációján, a kapillárisok körül csoportosulva marad fenn.
5. Kimutattuk, hogy a sejt migrációt szabályozó CXCR4 receptor felnőtt állatok bursai folliculusainak kérgi B lymphocytáin heterogén módon expresszálódik: az alacsony (CXCR<sup>low</sup>) expressziót mutató B lymphocyták a kéreg-velő határ közelében, míg a magas CXCR4 expressziót (CXCR<sup>high</sup>) mutató sejtek a külső kéregállományi területen lokalizálódnak. Kettős jelöléssel igazoltuk, hogy a 7H3 antigén expressziója a CXCR4<sup>low</sup> B lymphocytákra jellemző.
6. *In vivo* és *in vitro* kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a 7H3 ellenanyag funkció blokkoló hatást kifejtve gátolja a B lymphocyták migrációját.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Nagy, N., Busalt, F., Halasy, V., Kohn, M., Schmieder, S., **Fejszak, N.**, Kaspers, B., & Härtle, S. (2020). In and Out of the Bursa-The Role of CXCR4 in Chicken B Cell Development. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01468>; **IF: 7,561**

**Fejszák, N.**, Kocsis, K., Halasy, V., Szőcs, E., Soós, Á., Roche, D. von la, Härtle, S., & Nagy, N. (2022). Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a B cell subpopulation in bursa of Fabricius. *Poultry Science*, 101(4). <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2022.101711>; **IF: 4,014**

### A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

Kocsis, K., Benyeda, Z., Bódi, I., Molnár, D., Nagy, N., **Fejszák, N.**, Palya, V., & Oláh, I. (2012). Chicken dendritic cells and type II pneumocytes express a common intracellular epitope. *British Poultry Science*, 53(3), 397–400. <https://doi.org/10.1080/00071668.2012.703775>; **IF:1,147**

Nagy, N., Barad, C., Graham, H. K., Hotta, R., Cheng, L. S., **Fejszak, N.**, & Goldstein, A. M. (2016). Sonic hedgehog controls enteric nervous system development by patterning the extracellular matrix. *Development (Cambridge, England)*, 143(2), 264–275. <https://doi.org/10.1242/DEV.128132>; **IF: 5,843**

Bódi, I., Kocsis, K., Benyeda, Z., **Fejszák, N.**, Molnár, D., Nagy, N., & Oláh, I. (2016). Dual secretion locations on type II cells in the avian lung suggest local as well as general roles of surfactant. *Journal of Morphology*, 277(8), 1062–1071. <https://doi.org/10.1002/JMOR.20556>; **IF: 1,655**

Dóra, D., **Fejszák, N.**, Goldstein, A. M., Minkó, K., & Nagy, N. (2017). Ontogeny of ramified CD45 cells in chicken embryo and their contribution to bursal secretory dendritic cells. *Cell and Tissue Research*, 368(2), 353–370. <https://doi.org/10.1007/S00441-017-2595-YA>; **IF: 3,043**