

NYILATKOZAT

Név: Soós Ádám

ELTE Természettudományi Kar, szak: Biológus MSc

NEPTUN azonosító: M149XB

Diplomamunka címe:

A kéregállomány sejtes és molekuláris összetétele a bursa Fabricii limfoid folliculusaiban

A **diplomamunka** szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló szellemi alkotásom, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam, mások által írt részeket a megfelelő idézés nélkül nem használtam fel.

Budapest, 2021.05.14.



a hallgató aláírása

A kéregállomány sejtes és molekuláris összetétele a bursa Fabricii limfoid follikulusaiban

Diplomamunka
Biológus mesterszak
Molekuláris, Immun- és Mikrobiológia specializáció

készítette:
Soós Ádám

témavezető:
Dr. habil. Nagy Nándor
egyetemi docens
Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

belső konzulens
Dr. Erdei Anna
egyetemi tanár
Immunológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2021

I. TARTALOMJEGYZÉK

I. TARTALOMJEGYZÉK.....	1
II. BEVEZETÉS.....	2
III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
1. A BURSA FABRICII FELFEDEZÉSÉNEK TÖRTÉNELMI ÁTTEKINTÉSE ÉS JELENTŐSÉGE	3
2. A BURSA FABRICII MORFOLÓGIÁJA	4
3. A BURSA FABRICII VELOÁLLOMÁNYÁNAK JELLEMZÉSE	5
4. A BURSA FABRICII KÉREGÁLLOMÁNYÁNAK JELLEMZÉSE	7
5. A BURSA FABRICII EMBRIONÁLIS FEJLŐDÉSE	9
6. B-SEJTEK FEJLŐDÉSE.....	10
6.1. A <i>prebursális</i> szakasz:.....	11
6.2. A <i>bursális</i> szakasz:.....	11
6.3. A <i>posztbursális</i> szakasz:.....	12
IV. CÉLKITŰZÉSEK.....	13
V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	14
1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK	14
2. MINTÁK SZÖVETANI ELŐKÉSZÍTÉSE ÉS FELDOLGOZÁSA	14
2.1. <i>Fagyasztott zselatinos blokk készítése</i>	14
2.1.1. Beágyazáshoz használt oldatok:.....	14
2.2. <i>Fagyasztott blokkok metszése</i>	15
3. METSZETEK IMMUNCITOKÉMIAI ÉS IMMUNFLUORESZCENS VIZSGÁLATA	15
3.1. <i>Immunhisztokémia</i>	15
3.2. <i>Egyszeres immunfluoreszcens festés</i>	16
3.3. <i>KETTŐS IMMUNFLUORESZCENS FESTÉS</i>	17
4. FELHASZNÁLT ELLENANYAGOK.....	17
5. <i>IN SITU</i> HIBRIDIZÁCIÓ	19
6. TÁPOLDATOK ÉS SEJT TENYÉSZTÉSEK:.....	20
6.1. <i>B-sejtek in vitro migrációs kísérlete</i>	20
7. A SHH-RCAS RETROVÍRUS MIKROINJEKTÁLÁSA	21
8. CHORIOALLANTOIS-MEMBRÁN TRANSZPLANTÁCIÓ (CAM).....	21
9. ELEKTRONMIKROSKÓPOS PREPARÁTUMOK KÉSZÍTÉSE	23
10. A METSZETEK KIÉRTÉKELÉSE	23
11. AZ ADATOK STATISZTIKAI ELEMZÉSE.....	23
VI. EREDMÉNYEK.....	24
1. A KÉREGÁLLOMÁNY SEJTES ÖSSZETÉTELE	24
2. A KÉREGÁLLOMÁNY EXTRACELLULÁRIS MÁTRIX MOLEKULÁI	29
3. A KÉREGÁLLOMÁNY EMBRIONÁLIS KIALAKULÁSA	31
4. TENASZCIN-C GÁTOLJA A B-SEJT PREKURZOROK MIGRÁCIÓJÁT	32
VII. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	36
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS	38
IX. SUMMARY	39
X. HIVATKOZÁSOK.....	40
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	44

II. BEVEZETÉS

A primer nyirokszervek felelősek a limfociták osztódásáért, éréséért és egyedi differenciálódásáért. A limfociták általános immunológiai szerepe a humorális immunválaszban rejlik. Két típusú limfocitát különböztetünk meg; a B-sejtek ellenanyagokat termelnek, amelyeket baktériumok, vírusok és toxinok felismerésére használnak, a T-sejtek elpusztítják a vírussal fertőzött vagy rákossá vált sejteket. Az evolúció során limfociták először a halakban jelentek meg. Porcos halakban a B-sejtek fejlődése először a májban, majd a vesében, végül a lépben történik. Csontos halak esetében az elővese a B-sejt képzésének helye. Kételtűeknél és hüllőknél először a májban és a lépben következik be a B-limfocita fejlődés, később a májban megszakad, a lépben fennmarad, majd végül a csontvelőbe helyeződik át. A madaraknál a B-sejtek fejlődése az utóbél hámszármazékából létrejövő speciális nyirokszervben, a bursa Fabricii-ben történik. A bursa Fabricii (BF) az a madárspecifikus nyirokszerv, ahol a B-sejtek érése, a T-sejtektől és a myeloid sejtvonal fejlődésétől elkülönülten zajlik. Emlősökben a B-sejtek fejlődése a csontvelőben zajlik.

A csirke, mint modellállat, az immunológia történetében kiemelt szerepet kapott, hiszen az interferonok felfedezése, a vakcinák előállításának, az MHC rendszer és a limfociták leírása is itt történt először. Az immunológiai kutatásokban azért is fontos, mert specifikus primer limfoid szerve, a BF, a B-limfocita differenciálódásnak kizárólagos szerve. A B-sejtek itt válnak elkötelezett és funkcióképes immunsejtekké, melyek antigén-specifikus immunválasz kialakítására képesek. A B-sejtek érése a bursa Fabricii-ben egy speciális mikro környezetben, a folliculusokban zajlik, ami velő- és kéregállományra különül el. A velőállomány már embrionálisan kifejlődik, a kéregállomány később jelenik meg. A kéregállomány szerkezetéről és funkciójáról kevesebb információval rendelkezünk, de régóta feltételezik, hogy a szekunder nyirokszerveket a folliculusok kéregállományából származó B-limfociták népesítik be.

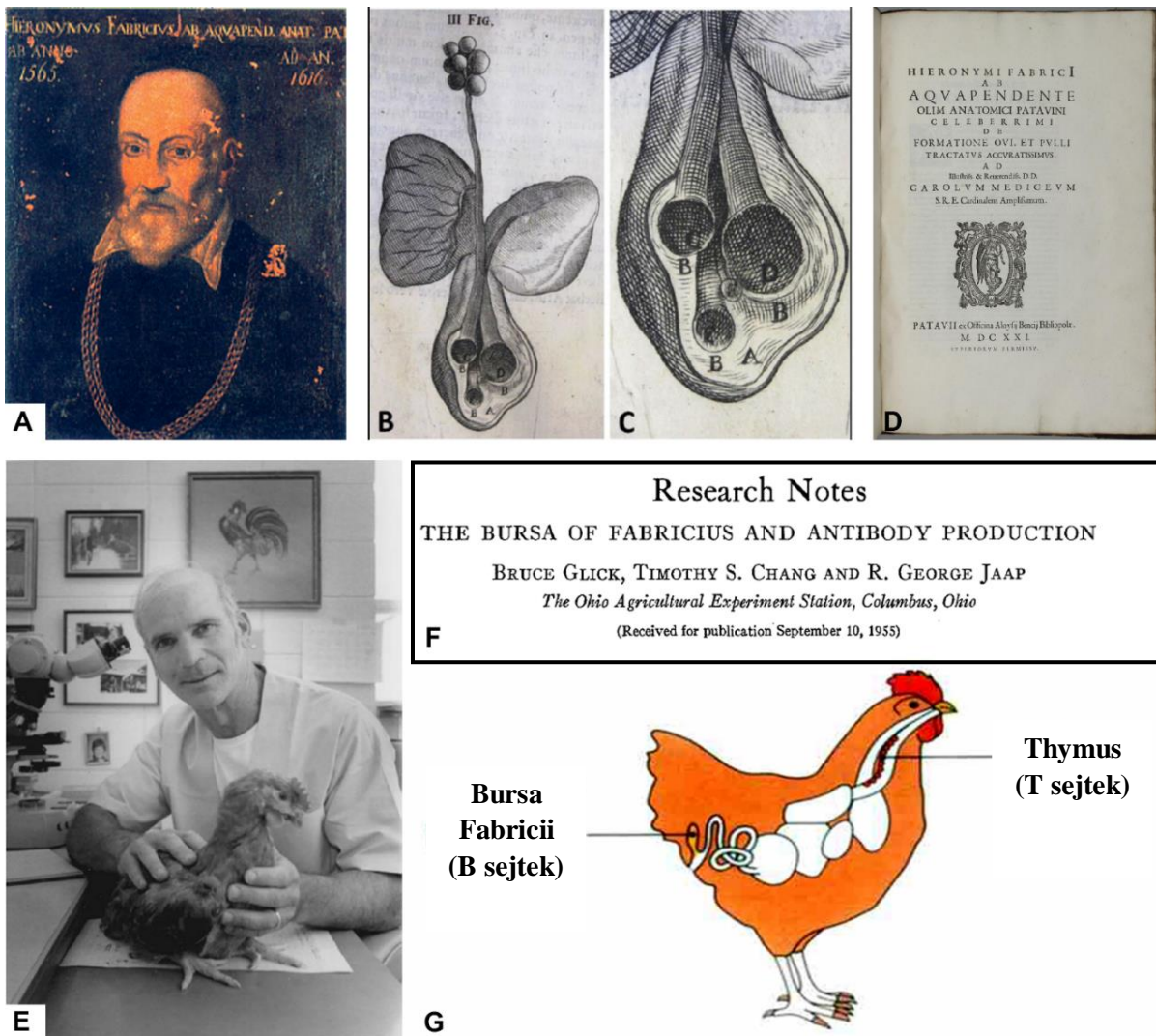
Az elmúlt évtizedekben a Semmelweis Egyetem Óssejt és Kísérletes Embriológia Laboratóriumában hisztológiai, immunológiai és fejlődésbiológiai módszerekkel tanulmányoztuk a madár nyirokszervek fejlődését. Kísérletes munkám célja a bursa Fabricii felépítő limfoid folliculusok kéregállományának sejtes és molekuláris szintű karakterizálása és az extracelluláris mátrix eloszlásának jellemzése az embrionális fejlődés során.

III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A bursa Fabricii felfedezésének történelmi áttekintése és jelentősége

A bursa Fabricii madarakra jellemző primer nyirokszerv. 1621-ben írta le először Hieronymus Fabricius ab Aquapendente a páduai egyetem anatómus professzora (1A-D. ábrák) aki úgy hitte, hogy a szerv a spermiumok tárolásáért felelős a madarakban. Funkciója csak jóval később, a 20. század közepén derült ki. 1956-ban Bruce Glick és Timothy Chang az Ohio State Egyetem kutatói számoltak be arról, hogy a bursa sebészi eltávolítása a kikelt csirkékből jelentősen csökkentette a felnőttkori antigén-specifikus ellenanyag termelést (1E, F. ábrák) (Ribatti, 2010). Ezzel a kísérlettel először mutatták ki, hogy a bursának elengedhetetlen szerepe van az immunválaszban és az ellenanyag termelésben (Glick, 1956). A bursa funkciójának felfedezése után, Jacques Miller kimutatta a tímusz szerepét a T-sejtek érésében. Ez a két mérföldkőnek számító felfedezés alapozta meg a központi, illetve perifériás limfoid szervek fogalmát és a B-sejt-T-sejt dogmát (Cooper és Petersont, 1965; Garcia, 2019). A központi vagy primer limfoid szervek azok, amelyekben a limfociták érnek, ide tartozik a csecsemőmirigy (a T-limfociták forrása) és a madaragnál a bursa Fabricii (1G. ábra), viszont az emlősök esetében a csontvelő a B-limfociták forrása. A perifériás vagy szekunder limfoid szervekben (a lép, a nyirokcsomók, bélhez asszociált nyirokszervek) található az érett T- és B-limfociták, amelyek adaptív immunválaszt indítanak el. A madarak bursával és tímusszal rendelkeznek, amelyek műtéti úton eltávolíthatók, ezért egyedülálló kísérleti modellt nyújtanak a fejlődő T- és B-limfociták tanulmányozására.

A B-limfociták proliferációja és fejlődése emberben a csontvelőben (Abdou és Abdou, 1972), kérődzőkben az ileális Peyer-plakkokban (Reynolds és Morris, 1984) nyúlban pedig az appendixben történik (Pinheiro és mtsai., 2011). Ezeket a szerveket tekintik emlősökben bursa-ekvivalens nyirokszerveknek és általánosan elfogadott, hogy a humorális adaptív immunrendszer kialakulása - ami magába foglalja a B-limfociták kialakulását - ezekben zajlik. Az emlősökben az egyed egész élete során létrejöhet az immunglobulin gének átrendeződése, viszont madarakban ez a folyamat kizárólag az embrionális fejlődés során megy végbe a bursa Fabriciiiben (Ratcliffe, 2006). Ez a tulajdonság is azt mutatja, hogy a bursa Fabricii felelős a B-limfociták korai fejlődéséért, differenciálódásáért és ezért lehetett a B-sejtek fejlődésére irányuló kutatások kiemelt célszerve.

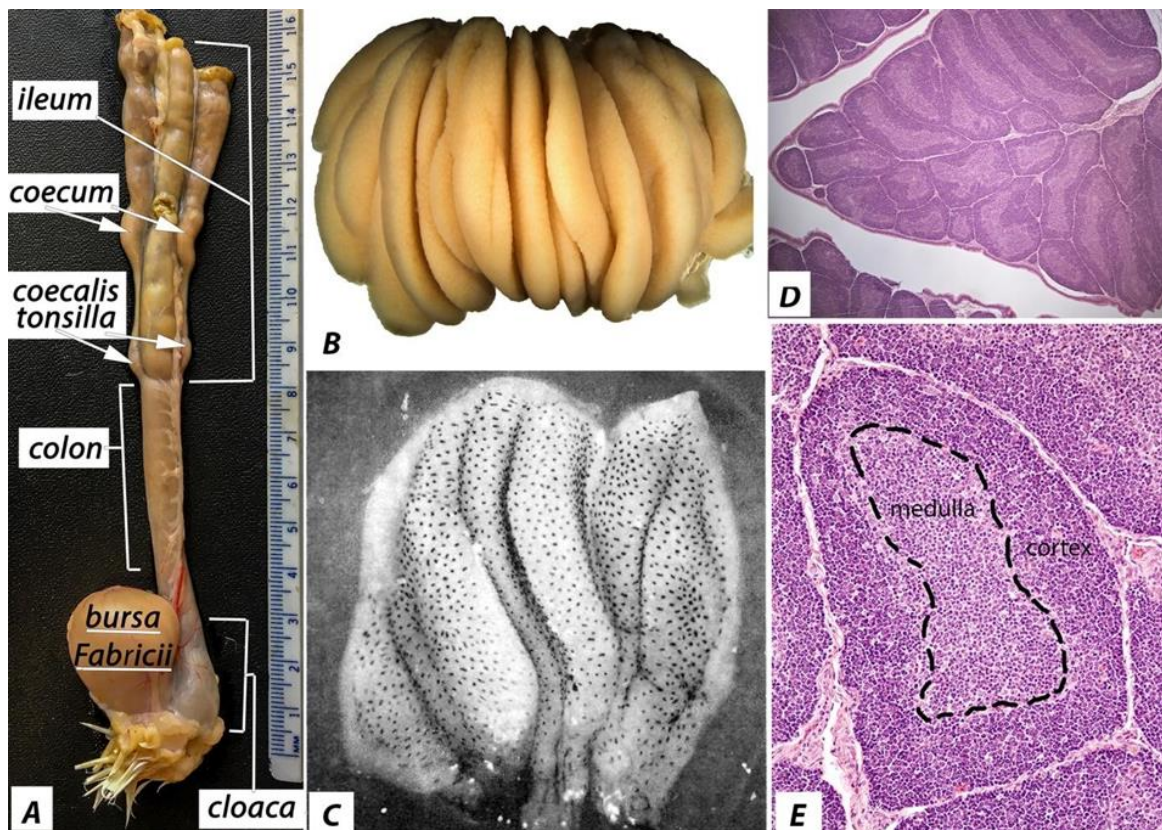


1. ábra. A bursa Fabricii felfedezése és funkciójának meghatározása. (A) Hieronymus Fabricius ab Aquapendente, olasz anatómus tekinthető a bursa felfedezőjének. (B, C, D) A bursa Fabricii ábrázolása Hieronymus Fabricius a *De Formatione Ovi et Pulli* című monográfiájában. (E) Bruce Glick a Mississippi egyetem professzora, a bursa immunológiai szerepének felfedezője. (F) A bursa szerepét tisztázó tudományos publikáció fejléce. (G) A madarak két primer nyirokszerve, a T-limfociták éréséért felelős tímusz és a B-limfociták éréséért felelős bursa Fabricii.

2. A bursa Fabricii morfológiája

Kifejlett állapotában a bursa Fabricii a vastagbél és a keresztcsont között helyezkedik el, gesztenye nagyságú, ovális alakú, és lumene kapcsolatban áll a kloáka proktodeum üregével (2A. ábra). A szerv redőkre tagolt, amelyben folliculusok rendeződnek egymás mellé (2B-D. ábrák) (I. Olah és Glick, 1978). A folliculusok a bursa Fabricii szerkezeti és működési alapegységei, melyek két jól elkülönült részből állnak: a velőállományból (medulla) és

kéregállományból (kortex), amelyeket bazális membrán választ el egymástól (2E. ábra). A velőállomány stromális alapvázat hámeredetű citokeratin+/E-kadherin+ retikuláris sejtek, míg a kéregállományt mezenchimális eredetű vimentin+/dezmin+ retikuláris sejtek alkotják. A medulláris alapállományt Lep100+/TIM4+ makrofágok (Balic és mtsai., 2019; Nagy és mtsai., 2016) és többségben Bu-1+/CXCR4+/IgM+ B-limfociták töltik ki. A velőállomány speciális sejt típusa az 1970-es évek végén felfedezett (Olah és mtsai., 1978) szekrécióna képes dendritikus sejtek (BSDC) található, melyeknek fontos szerepe van a B-sejtek proliferációjában (Olah és Nagy, 2013).



2. ábra. A bursa Fabricii elhelyezkedése, makroszkópos és mikroszkópos szerkezete.

(A) 4 hetes csirke bursa Fabricii anatómiai elhelyezkedése. (B) A felnyitott bursát hosszanti redők tagolják. (C) A folliculus asszociált epitélium specifikus jelölése. A festődő képletek száma megegyezik a bursa folliculusainak számával (Olah és Glick 1978). (D) A Bursa redőt a benne található folliculusok töltik ki. (E) A Bursai folliculus két részből áll: velőállomány (medulla) és kéregállomány (kortex) (Saját felvétel: A,B,D,E).

3. A bursa Fabricii velőállományának jellemzése

A folliculusok velőállományának vázát egy olyan hámtípus alkotja, amelyet retikuláris hámnak nevezünk. A velőállománybeli retikuláris sejtek nyúlványosak, csillag alakúak és egymáshoz dezmoszómákon keresztül kapcsolódva háromdimenziós hálózatot hoznak létre. E

kompartment szélén lokalizálódó sejtek nyúlványokkal nem rendelkeznek, ellaposodtak, a velőállomány felé árkádokat képeznek, és az alattuk húzódó bazális membrán folytonos a felszíni interfollikuláris epitélium (IFE) bazális membránjával. Itt olyan sejtek találhatóak amelyek az ún. kortiko-medulláris hámsejt réteget alkotják, ez választja el a kéregállományt a velőállománytól. A velő- és kéregállomány között, a kortiko-medulláris hámsejteken keresztül intenzív limfocita migráció zajlik (Oláh és mtsai., 2002). A bursa redők hámsejtekkel borított felszínének 90%-át interfollikuláris hám borítja (IFE). Az IFE sejtek apikális része mikrobolyhokkal tagolt, az ovális sejtmag a sejt közepén helyezkedik el. Az apikális citoplazmában mucin tartalmú granulumok vannak. A bazálisan lokalizálódott differenciálatlan sejtek nem érik el a felszínt (Bódi és mtsai., 2018; Kaiser és Balic, 2015).

A maradék 10% körüli hámot follikulus-asszociált hámnak nevezzük (FAE). Ezek olyan hámsejtszigetek, melyek összeköttetést teremtenek a bursa lumene és a follikulusok velőállománya között. Egy sejtrétegből álló, nagyméretű, piramis alakú sejtek alkotják, széles apikális és elkeskenyedő bazális résszel. Apikális felszínükön zonula occludenssel kapcsolódnak egymáshoz, nem találhatóak bennük mucint tartalmazó granulumok, felszínük kevesebb mikrobollyal tagolt. Laterális felszínük szabálytalan betüremkedéseket képez, ezekben az intercelluláris terekben számtalan vezikulum van (50-60nm). Keskeny bazális részük alatt nincs bazális membrán, hanem a follikulus-asszociált epitéliumot ellaposodott hámsejtek 3-5 rétege tartja, melyek dezmoszómákon keresztül kapcsolódnak a velőállomány hámretikulumához (Balic és mtsai., 2019; Olah és Glick, 1992).

A velőállomány egy másik jellegzetes sejtípusa a szekréción dendritikus sejtek (BSDC), melyek szerkezetileg némiképp eltérnek az emlősben ismert dendritikus sejtektől (Olah és mtsai., 1978). A szekréción dendritikus sejtek általában két aszimmetrikus nyúlvánnyal rendelkeznek, melyek hosszan elnyúltak, citoplazmatikus organellumaik elhelyezkedése nem egyenletes és ez jellegzetes polarizáltságot kölcsönöz a sejteknek. Az egyik nyúlvány fejlett durva felszínű endoplazmás retikulumot, Golgi-apparátust és nagyszámú granulumot tartalmaz. A másik sejtnyúlvány granulumokat nem tartalmaz és citoplazmatikus organellumokban szegény, főleg intermedier filamentumok töltik ki. A filamentumokat vimentin képezi, hasonlóan más dendritikus sejtekhez, illetve a bőr Langerhans sejtjeihez (De Waal és mtsai., 1984). A velőállomány dendritikus sejtjei aktív szekréción tevékenységet folytatnak és nevüket innen kapták. Ez a szekrétum elektronmikroszkóposan sűrű elektrodenz anyagként figyelhető meg. A szekréción dendritikus sejtek a CD45+ hematopoetikus eredetű sötét sejtekből differenciálódnak és a vimentin+ mellett NIC2+/74.3+ is kifejeznek (Nagy és mtsai., 2004).

Későbbi kutatások kimutatták, hogy a csirke dendritikus sejtek számos emlősökben is leírt markert tartalmaznak, mint például a CD83, DEC205 (CD2025; Staines és mtsai., 2013), CD11c (Nagy és mtsai., 2016), CSF1R+ (Balic és mtsai., 2019). A kiképzést követően a sejteket felszíni IgG+/MHCII+ jellemzi. Ezek a sejtek IgG-t nem termelnek, viszont a felszínükön immunkomplex formájában megkötik (Felföldi és mtsai., 2005). Vimentin+ alapján jól elkülöníthetőek a vimentint nem expresszáló B-sejtektől és a citokeratin+ mutató hámsejtektől.

A bursa Fabricii velőállományának hámja és dendritikus sejtjei mellett B-limfociták és kis számú makrofág is részt vesz a felépítésében. A velőállomány makrofág populációjának markerei a következők: KUL01 (Mast és mtsai., 1998); Lamp1 fehérjét jelölő Lep100 (Lippincott-Schwartz és Fambrough, 1987) és a TIM4 (Balic és mtsai., 2019).

A bursai folliculusokban lokalizálódó sejtek túlnyomó többsége B-limfocita, emiatt az elmúlt pár évtizedben számos specifikus monoklonális ellenanyag készült tanulmányozásukra és kimutatásukra, mint például a chB6/Bu-1 molekula, amely az éretlen és az érett B-sejteken (kivételt képezve a plazma sejteket) expresszálódik (P. Funk és Palmer, 2003). Az EIV-E12 (Pharr és mtsai., 1995) molekula a bursai szekretoros dendritikus sejtek prekursorait jelöli embrionálisan, amelyek a folliculus formáció megjelenése előtt, szorosan az epitélialis-mezenchimális határ alatt lokalizálódnak, de később a B-sejteken és a plazmasejteken is kifejeződik. Szialil Lewis^x/CD15 (Varki, 1994) marker egy szializált-fukozilált-laktózamin, amely a szelektinek egy természetesen előforduló liganduma, amely részt vesz a B-sejtek „homingjában” (Masteller és mtsai., 1995). Szintén expresszálódik a madarak B-sejtein a CXCR4 (Nagy és mtsai., 2020) molekula. A CD1 (Dascher, 2007) sejt felszíni protein, amelynek funkciója megegyezik az emlősökben leírtakkal, miszerint lipideket és glikolipideket prezentál T-sejtek számára (Lerner és mtsai., 1971). A medulláris B-limfociták a felszínükön IgM molekulát is expresszálnak (Olah és mtsai., 1992).

4. A bursa Fabricii kéregállományának jellemzése

A kérgi és a medulláris limfociták jelentős morfológiai és fiziológiai különbségeket mutatnak. Az előbbieket általában kisebbek, tömörebben helyezkednek el és gyorsabban osztódnak, mint a velőben (Nagy és mtsai., 2004). Korábbi kísérletek azt mutatják hogy legalább 3-4 prekursor sejt képes kortikális és medulláris populációkat egyaránt létrehozni (Pink és mtsai., 1985). A kéreg Bu-1+ B-limfocitái LT2 antigénre pozitívak, míg a velőben csak elszórtan található LT2+ sejt (Paramithiotis és Ratcliffe, 1994). IgM expresszió csak a velőben

figyelhető meg (Olah és mtsai., 1992). CXCR4 receptor kikelés után csak a kéregállományban lokalizálható (Nagy és mtsai., 2020). A CD80+ sejtek is a kéregállomány külső régiójában találhatóak (Lee és mtsai., 2011). A folliculusok embrionális fejlődése során a B-sejtek a folliculusbimbók hámrétikuluma között csoportosulnak és intenzíven osztódnak. Kikelés után az alaphártyán kívülre vándorolva a B-sejtek a bursális kéreg részt képezik (Paramithiotis és Ratcliffe, 1994).

A kéregállomány kikelés után két héttel éri el a kifejlett állapotot (Igyártó és mtsai., 2008). Alapállományát mezenchimális eredetű retikuláris sejtek (MRC) hálózata építi fel, amelyek vimentin+/dezmin+-ak. A mezenchimális eredetű retikuláris sejtek által létrehozott háromdimenziós struktúra lazább szerkezetű, mint a velőállomány hámeredetű retikuláris sejtek hálózata (Madej és mtsai., 2013) és extracelluláris mátrix (ECM) proteinek komplex hálózata jellemzi (kollagén I, kollagén III, fibronectin és tenascin-C) (Oláh és mtsai., 2013). Továbbá, minden egyes folliculusnak saját vérellátása van és ez a kapillárisokban gazdag érhálózat a kortiko-medulláris határon, az alaphártya mellett figyelhető meg a kéregállományban. A kéreggel ellentétben a velőállomány nem vaszkularizált (Abbate és mtsai., 2007). Feltételezik, hogy a kéregállomány retikulum sejtjei mellett elszórtan néhány makrofág és dentritikus sejt is előfordul (Oláh és mtsai., 2013).

A kikelést követő hetekben a bursa Fabricii intenzív limfopoetikus működést mutat, majd 3 hónapos kor után a szerv fokozatos involúciója figyelhető meg, amely White Leghorn csirkék esetében egy rövid, 8 hetes periódus alatt lezajlik. Az involúció során először a kéregállomány sejtjeinek a nekrozisa megy végbe, majd ez a jelenség a velőállományban is bekövetkezik (Ciriaco és mtsai., 2003). A nekrotikus folliculusok területein makrofág infiltráció figyelhető meg. Az involúció előrehaladásával egyre jobban csökken a folliculusok száma és nehezebb lesz a kéreg- és velőállomány elkülönítése, a limfoid folliculusok helyét fokozatosan kötőszövet veszi át. Ahogy a bursa elveszíti jellegzetes szöveti struktúráját, úgy B-sejt képzésének funkciója is megszűnik (Ciriaco és mtsai., 2003).

A kikeléstől az involúcióig a B-limfociták aktív vándorlása figyelhető meg a velő és kéreg között. A sejt-vándorlást irányító mechanizmus nem ismert. Csirke embriókban végzett *in situ* hibridizációs és *in vitro* sejt-migrációs vizsgálatok szerint a kéregállomány dezmin+ retikulumsejtjei CXCL12 kemokint termelnek és ez a molekula tehető felelőssé a kéreg velőből származó benépesüléséhez (Nagy és mtsai., 2020). Szintén e közlemény adatai alapján feltételezhető, hogy a kérgi CXCR4+ B-sejtek a kapillárisokon kilépve kolonizálják a perifériás nyirokszerveket. Kivándorolnak a perifériára az erek mentén, így a periférián található B-

limfociták a folliculáris kéregállományból származtathatóak (Paramithiotis és Michael, 1994). Az a folyamat viszont, hogy hogyan jutnak oda és valamilyen szelekción átesnek-e, még nem tisztázott (Madej és mtsai., 2013). Egyes hipotézisek szerint a bursából távozó sejtek egy része a külső környezet antigénjeinek hatására szelekción esik át a velőállományban. A periférián észlelt B-limfociták azonban bizonyítottan a kéregállomány gyorsan osztódó sejtjeiből származtathatóak (Paramithiotis és Ratcliffe, 1994). Ez a B-sejt populáció naív és rövid életűsejtekből áll, hiszen a környezet antigénjei általi szelekción nem mentek át (Paramithiotis és Michael, 1994).

5. A bursa Fabricii embrionális fejlődése

A bursa Fabricii embrionális fejlődése különböző stádiumokra tagolható.

Első stádium: A szerv epitélío-mezenchimális telepének megjelenése. Az embrionális fejlődés 5. napján a kloákalemez vezikulumszerű megnagyobbodása figyelhető meg a proctodeális régióban, ami a bursa epiteliális telepét képezi és ez hámcsap formájában kezd benőni a farokbimbó mezenchimájába (Nagy és Oláh, 2010). A lumen kialakulása az embrionális fejlődés 5-7. napján történik, mely úgy jön létre, hogy a hámcsap belsejében intenzív vakuolizáció történik, és a vakuólumok összenyílásával kialakul a hámsejtekkel bélelt üreg (I. Oláh és mtsai., 1986). A 9. naptól kezdődve a bursa lumene redőkre tagolódik, mely a mezenchimasejtek proliferációjának köszönhető.

Második stádium: A folliculus kezdemények indukciója. A folliculus képződés egybeesik a hematopoetikus eredetű CD45+ sejtek kolonizációjával. Toluidinkék festett félvékony bursa kezdemény metszeteken az embrionális fejlődés 10. napjától kétféle sejtet lehet megkülönböztetni a mezenchimában: egy erősen bazofil festődést mutató "sötét sejtet" és egy "világos sejtípust". A „sötét sejtek” a hám alatt tömörülnek, a 11-12. napon átlépik a bazális membránt, a felszíni hámra vándorolnak és intenzív osztódásba kezdenek. A „sötét sejtekkel” benépesült epitélium bimbószerűen a mezenchimába nő, az epitelsejtek maguk előtt tolják az alaphártyát és kialakítják az első folliculus kezdeményeket. Később ebből lesz a folliculusok velőállománya (Nagy és mtsai., 2001). A folliculus indukciót elindító „sötét sejtéből” differenciálódnak a velőállomány CD45+/74.3+/CSF1R+/MHCII+ szekréción dendritikus sejtjei. A „világos sejtek” a mezenchimában maradnak és a későbbiekben feltehetően a kéregállomány retikuláris sejtjeit hozzák létre (Nagy és mtsai., 2004).

A harmadik stádium: A follikulusbimbók B-sejtes kolonizációja. A fejlődés 10-15. napjára 3-4 B-sejt prekursor benépesíti az egyes follikulumok kezdeményeket, és intenzív osztódása során kialakul a follikulumok B-sejt populációja (Pink és mtsai., 1985; Ratcliffe, 2006). A B-sejtes kolonizációval egyidőben megtörténik az immunglobulin gének átrendeződése, és azok a limfociták, amelyek nem képesek felszíni immunglobulin szintézisére, apoptózissal eltávolításra kerülnek. A génkonverziós folyamatok hatására alakul ki a madarak diverz immunglobulin repertoárja. Habár a folyamat nem teljesen tisztázott, a génátrendeződéshez szükséges stromális mikroenvironment kialakításában és a folyamatot szabályozó mechanizmusokban fontos szerepet tulajdonítanak a szekréciónak dendritikus sejteknek (Nagy és mtsai., 2004; Oláh és Nagy, 2013; Ratcliffe, 2006).

A negyedik stádium: Az embrionális fejlődés utolsó hetére megtörténik a follikulum asszociált epitélium (FAE) kialakulása, ami a növekvő follikulumkezdemény limfo-epitéliális kompartmentje fölött egy jellegzetes follikulum-asszociált hámsejt réteg (Dolfi és mtsai., 1988; Nagy és mtsai., 2001). Ez a speciális hám nem rendelkezik bazális membránnal, mert a follikulusbimbók növekedése során a felszíni epitéliális sejtek a mezenchima felé tolódnak, együtt az alaphártyával, ami végül a kifejlett follikulum kéreg-velő határvonalát alakítja ki. A follikulum-asszociált epitélium közvetlen kapcsolatot teremt a follikulum velőállománya és a bursa lumene között, ezért egyik legfontosabb szerepe a különböző antigének bejuttatása a follikulumokba.

Az ötödik stádium: A kéregállomány kialakulása. A velőállománnyal ellentétben, a bursa follikulumok kéregállományának embrionális fejlődéséről és differenciálódásáról kevés információval rendelkezünk. Feltételezzük, hogy kialakulása a kikelés után veszi kezdetét.

6. B-sejtek fejlődése

Az embrionális fejlődés folyamán a bursa follikulumok stromális előtelepét kívülről bevándorló hematopoetikus eredetű sejtek népesítik be, Hematopoetikus őssejtek a bursa telepének vaszkularizációja révén jutnak a follikulum bimbók közelébe (Moore és Owen, 1965). A CD45+ hematopoetikus őssejtekből még a bursa kolonizációja előtt Ikaros (korai-B-sejt faktor) és Pax5 transzkripciós faktorok hierarchikus sorrendben történő kifejeződése eredményeképpen extrabursálisan kialakulnak a B-limfocita progenitorok (Lampisuo és mtsai., 1998; Yvernogeu és mtsai., 2019).

Toivanen és Toivanen (1973) kimutatták, hogy a fiatal bursában vannak olyan sejtek, amelyek képesek teljes mértékben helyreállítani a besugárzott madarak B-sejtvonalát (Toivanen és Toivanen, 1973). Ezeknek a sejteknek véges élettartama van a madarakban, és számuk a fejlődés során fokozatosan csökken, a kikelés után kb. 2 hétre már nem észlelhetők. Ezeket a sejteket bursális őssejteknek nevezték el. Houssaint és munkatársai meghatározták a bursális őssejtek fejlődését (Houssaint és mtsai., 1976). Kimutatták a bursa sejtek fluoreszcens áramlási citometriával történő elválasztása (cell sorting) során, hogy a prebursális B-sejtek Bu-1+-ak. Azok a sejtek amelyekre nincs Bu-1 expresszió, nem képesek a bursát regenerálni (Houssaint, 1987). Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a bursális őssejtek a bursában IgG expresszió irányába elköteleződnek, ami azt sugallja, hogy az immunglobulin lókuszkok átrendeződés már a bursán kívül megtörtént (Ratcliffe és mtsai., 1986; Weill és mtsai., 1986). Ezt PCR vizsgálatokkal is alátámasztották (Ratcliffe, 2006).

Madarokban transzplantációs és embriómanipulációs vizsgálatok alapján a B-sejtek fejlődése három szakaszra osztható: prebursális, bursális és posztbursális szakasz.

6.1. A prebursális szakasz:

A fejlődés során a prebursálisan képződött Bu-1+/IgM+ B-sejt progenitorok kolonizálják a bursa Fabricii telepét, és a mezenchimában telepednek meg. Amikor a B-limfocita progenitorok differenciálódása megindul, akkor az immunglobulin gének átrendeződnek. A génátrendeződés során a progenitor sejtek DNS-ében az immunglobulin gének szomatikus rekombináción esnek át. Először a nehézlánc gének átrendeződése történik meg, majd ha ez sikeres, akkor megindítja a könnyűlánc VJC génjeinek az átrendeződését. A génátrendeződéseket madarakban is a Rag-1 és Rag-2 rekombináz enzimek szabályozzák. Szemben az emlősökkel, a madarak csak egy funkcionális V és J génnel rendelkeznek, így ez csak egy nagyon limitált immunglobulin repertoárt tesz lehetővé (Reynaud és mtsai., 1985, 1987).

6.2. A bursális szakasz:

Ebben a stádiumban a Bu-1+/IgM+ limfoid progenitorok a folliculus-bimbóba vándorolnak (Houssaint, 1987). A kolonizációban fontos szerepet tölt be az SSEA1 szelektin molekula a B-limfocita progenitor felszínén, amely amikor a kolonizáció befejeződik, eltűnik a sejtek felszínéről. A sejtadhéziós molekulák (CAM-cell adhesion molecules) ugyancsak részt vesznek a B-sejtek folliculus "homingjában". A progenitorok migrációjuk során HEMCAM sejtadhéziós molekulákat expresszálnak, és a folliculusbimbó hámsejtjein megjelenő HEMCAM-al homofil kötődést képezve jutnak a hámsejtek közé (Vainio és mtsai., 1996). A

follikulus-bimbókban lokalizálódó B-limfocita progenitorok osztódásával párhuzamosan a gének konverziója is megtörténik és ennek köszönhető az immunglobulinok sokfélesége. (Reynaud és mtsai., 1989). A pszeudogének beépülése akár 7-10-szer is megtörténhet egy adott sejt életében. Így valósul meg a V gének szomatikus diverzifikációja, és ezáltal a 10^7 – es nagyságrendű immunglobulin-készlet kialakulása. Ezek után az átalakult immunglobulin génekkel rendelkező sejtek gyors felszaporodása (klonális expansziója) megy végbe. Emellett a nagymértékű osztódás mellett az apoptotikus sejtek száma is nagy és így kisselektálódnak a genetikailag hibás, funkcióképtelen és a saját antigéneket felismerő receptorokat hordozó B-limfociták. Az itt található makrofágok távolíthatják el az elpusztult sejteket (Hu és mtsai., 2019). Mivel a gének konverziója csak a bursa follikulusaiban történik meg, ezért a folyamat során a progenitor sejtek genetikai programját a follikusok stromális sejtjeinek (szekréción dendritikus sejtek, hámretikulum sejtek) közvetlen vagy citokin közvetített hatása irányíthatja (Reynaud és mtsai., 1992). A bursa follikus stromális sejtjei által alkotott molekuláris mikroenvironment természetű és pontos szabályozási folyamatának részletes jellemzése közelebb vinne a B-sejtek fejlődését irányító folyamatok megismeréséhez.

6.3. A posztbursális szakasz:

A velőállományban gének konverzió után átesett B-limfociták a kikelés előtt néhány nappal a kéreg-velő határ hámsejtjeinek alaphártyáját áthatolva kilépnek a velőállományból, és a mezenchimális retikuláris sejtek közé telepedve kialakítják a kéregállományt (Fellah és mtsai., 2013). A velőállomány immunkompetens B-limfocitái a kéregbe vándorlás előtt kevés CXCR4/LT2 antigént expresszálnak és csak azután hagyják el a bursát (Nagy és mtsai., 2020), majd a B-sejtek a kéregállományból a vér- és nyirokkeringésbe jutva a szekunder nyirokszervekben (lég, coecalis tonsilla, Harder mirigy, Meckel divertikulum, corpus pineale) telepednek meg. A kéregállományban a B-sejtek differenciálódását irányító sejtes és molekuláris folyamatok nem ismertek. Feltételezzük, hogy a kéregállomány mikroenvironmentének részletesebb megismerése hozzájárulna a B-sejtek bursában zajló lépéseinek jobb megismeréséhez.

IV. CÉLKITŰZÉSEK

A bursa Fabricii funkcióját célzó kísérletek korábban a folliculusok velőállományát helyezték előtérbe, a kéregállomány szerkezetéről és funkciójáról kevés ismerettel rendelkezünk.

Szaktervezési munkám célkitűzései a következők voltak:

- A folliculáris kéregállomány szövettani vizsgálata immuncitokémiai és elektronmikroszkópos módszerekkel.
- A extracelluláris mátrix molekulák jellemzése a folliculusok kéregállományában.
- A kéregállomány fejlődésének, ontogenezisének vizsgálata.

V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Kísérleti állataink White Leghorn típusú, SPF (Specific-pathogen-free) csirkék voltak. A tojásokat kereskedelmi tenyésztőktől (Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt.) szereztük be. A tojásokat 37,7 ° C-on inkubáltuk, és az embriók korát az inkubációs napok száma (ED) alapján határoztuk meg. A tojások inkubálása a laboratórium keltetőgépeiben (Heka-Brutgerate, TS-7000C) történt, a kikelt állatok pedig 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 kiboncolását követően hisztológiai vizsgálatokra az embrionális és felnőtt szerveket 4%-os paraformaldehidben fixáltuk 1 órán át. Ezután foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) mostuk 3x5 percig majd PBS-es mosás után ejszkára 15%-os szacharózban 4 °C-on tároltuk. A kiágyazás során 7,5%-os zselatinba helyeztük a bursa Fabriciiket 37 °C-on 2 órán át. A felmelegített 7,5%-os zselatint kiöntöttünk egy kis műanyag tálka aljára és ráhelyeztük a bursa darabokat, orientáltuk, majd szilárdulást követően teljesen lefedtük zselatinnal. Amikor megszilárdult, a zselatinos szövetblokkot 1x1 cm méretűre vágtuk és előre feliratozott kartonpapírra ragasztottuk Shandon Cryomatrix segítségével, majd -60 °C-os izopentánban (az izopentán előre le van hűtve folyékony nitrogén segítségével) lefagyasztottuk. A zselatin kockán filctollal bejelöltük a szerv helyzetét, illetve a metszés irányát. A fagyasztás 1 percen át történt, amelyet követően az elkészült blokk azonnal metszhető. Abban az esetben, ha nem került felhasználásra, -80 °C-on tároltuk a preparátumot.

2.1.1. Beágyazáshoz használt oldatok:

- 1 liter PBS összetétele: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,42 g Na₂HPO₄ x 2H₂O; 0,2 g KH₂PO₄; desztillált víz.

- A szacharóz tartalmú PBS puffer: 15 g D-szacharózt oldottuk fel 100 ml PBS-ben, majd az oldatot 4 °C-on hűtőben tároltuk, a szacharózt (15 m/V%) és zselatint (7,5 m/V%) tartalmazó PBS puffert pedig -20°C-on fagyasztva tároltuk.
- Puffereelt 4%-os paraformaldehid (PFA, pH=7,4): 700 ml desztillált vizet lombikban 60°C-ra melegítettük fel. 40 g paraformaldehidet adtunk hozzá és mágneses keverőre helyeztük. A keletkezett csapadékot cseppenként hozzáadott 20%-os (0,5 M) NaOH-dal oldottuk fel. Az oldatot megszürtük, majd 250 ml 0,24 M PBS-t adtunk hozzá. Beállítottuk az oldat pH-át, majd az oldatot átöntve 1000 ml-es mérőhengerbe, a térfogatát desztillált vízzel kiegészítettük 1000 ml-re.

2.2. Fagyasztott blokkok metszése

A fagyasztott preparátumok metszése Shandon gyártmányú kriótómmal történt. A zselatinos szövet blokkokat leválasztva a kartonpapírról, a kriótóm blokktartójára ragasztottuk Shandon Cryomatrix segítségével, majd a kriosztátba helyeztük. A metszési hőmérséklet -28 °C. A blokkok befaragása után 10-12 µm vastagságú metszeteket készítünk, melyeket 0.01%-os poly-L-lysin-nel (SigmaAldrich, St. Louis, MI, USA) bevont tárgylemezekre veszünk fel. Felhasználásig a lemezeket mélyhűtőben tároljuk -20 °C-on.

3. Metszetek immuncitokémiai és immunfluoreszcens vizsgálata

Az immuncitokémiai egyszeres, illetve kettős immunfluoreszcens festéseket fagyasztott metszeteken végeztük.

3.1. Immunhisztokémia

A festési protokoll első lépéseként a metszeteket 10 percig PBS-el telt küvettában rehidráljuk. Zselatinos metszetek esetén a rehidrálás 37 °C-os PBS-ben történik. Ezzel a lépéssel a zselatint oldjuk ki. Rehidrálást követően a tárgylemezeket gondosan letörölgetjük, hogy megakadályozzuk így a különböző ellenanyagok összefolyását. Kisebb szövetminták esetén ajánlatos a minta körbekarcolása, mely szintén megakadályozza az összefolyást, illetve a metszet könnyű lokalizációját biztosítja. A primer ellenanyagok (1.táblázat) hígítása 1%-os PBS-BSA oldatban történik. A primer ellenanyaggal lefedett metszeteket (a minta nagyságától

függően 60-100 µl kerül rámerésre) 45 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten, nedves kamrában, amit 3x5 percig tartó PBS-es mosás követett. Ezt követően a primer ellenanyagok megfelelő izotípusú és állatfajú biotinilált szekunder ellenanyagot (2. táblázat) hígítottunk PBS-BSA-ban, amelyet a metszetre mérve, az előző lépéshez hasonlóan 45 percig inkubáltuk. Ezt a lépést követi a szöveti endogén peroxidáz blokkolása, amely 30%-os H₂O₂ (AnalaR NORMAPUR® analytical reagent, cat. no.: 23619.297) oldatot tartalmazó küvetében történik szobahőmérsékleten, 10 percig. Újabb 3x5 perces PBS-es mosás után a mintákra 1:100-as hígításban elkészített avidin-biotin peroxidáz komplexet (ABC Peroxidase Staining Kit Standard, Life Technologies, cat. no.:32020) mérünk és 30 percig inkubáljuk. Ezzel egyidőben kloronaftol törzsoldatot (Chloronaphthol Substrate Powder, 4-chloro-1-naphthol, ThermoScientific, cat. no.:34010) hígítunk, 50 ml PBS-hez 50 ml kloronaftol törzsoldatot mérünk, amit sötétben mágneses keverőn 30 percig kevertettünk. Az oldatot átszűrtük és felhasználásig sötétben tároltuk. Az ABC-vel történő inkubáció után 3x5 perces PBS-es mosás következett, majd a metszetek az elkészített kloronaftolos oldatban hívódnak elő. Felhasználás előtt a kloronaftolos oldatba 250 µl 3%-os H₂O₂ oldatot mérünk. Az előhívás pedig sötétben történt 30 percig, mialatt a konjugált peroxidáz enzim lilás csapadékot állít elő az ellenanyag kötődésének helyén. Végül 3x5 perces PBS mosás történt, majd vízzoldékony lefedőanyaggal (Mowiol 4-88, Sigma Aldrich, cat. No. 81381-25G) lefedtük a metszeteket. Az elkészült lemezeket 4 °C-on tároltuk.

Kloronaftol oldat készítése: törzsoldat készítéséhez 500 mg 4-kloro-1-naftolt (Sigma, C8890) 2 ml abszolút etanolban feloldottunk (Molar Chemicals Kft, 02910-101-340) és -20 °C-on tároltuk. Előhíváskor a törzsoldatból 100x-os oldatot hígítottunk (a végtérfogat 25 mg/100 ml PBS).

1%-os PBS-BSA: 1 g BSA-t (Bovine Serum Albumin; Sigma, A9647), 100 ml PBS-ben feloldottunk. Szűrés után 0,1 %-ban NaN₃-at adtunk hozzá.

3.2. Egyszeres immunfluoreszcens festés

Az immunfluoreszcens festés során a metszetek előkészítése és a primer ellenanyaggal történő inkubálása az immuncitokémia során ismertetett módon történik. Második lépésben a metszetekre fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyagot mérünk (2. táblázat), melyet PBS-ben 1:200 arányban hígítottunk. Az ellenanyaggal történő inkubálást 45 percig, szobahőmérsékleten, fénytől védetten, nedves kamrában végeztük. A sejtmagok festése DAPI-

val (4,6 diamidino-2-phenylindole, Invitrogen, cat. no.: 62247) történt, melyet az inkubáció 30. percében mértünk a metszetekre, mintánként 100 µl-t. A metszeteket sötétben, 4°C-on hűtőben tároltuk.

3.3. Kettős immunfluoreszcens festés

Annak érdekében, hogy bizonyos molekulák expresszióját más antigénekkal is összehasonlítsuk, kettős immunfluoreszcens festéseket végeztünk. Az előkészített metszetekre ráértük az első primer ellenanyagot, melyet 1 órán át inkubáltunk, majd mosást követően (3x5 perc PBS-ben), fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyagot mértünk rá, amely a primer ellenanyag izotípusára specifikus. A szekunder ellenanyag 45 perces inkubálása után, mosás, majd a második primer ellenanyag rámerése következett. Ennek inkubációs ideje szintén 1 óra, amit PBS-es mosás követett. A második szekunder ellenanyagot úgy választottuk ki, hogy fluoreszcenciája eltérő legyen az előző körben használt fluorokrómtól. Az inkubációs idő ez esetben is 45 perc volt, aminek 30. percében a metszetekre DAPI-t mértünk és lefedtük.

4. Felhasznált ellenanyagok

1. táblázat. Felhasznált primer ellenanyagok listája

Primer ellenanyagok	Klón neve	Cég/Származás	Izotípus
anti-kollagén I	SP1D8	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)	IgG1
anti-kollagén III	3B2	DSHB	IgG1
anti-kollagén IV	IIB 12	Dr. Thomas Linsenmayer, Boston, USA	IgG1
anti-kollagén VI	5C6	DSHB	IgG1
Anti-kollagén IX		DSHB	IgM
anti-kollagén XVIII	6C4	DSHB	IgG1
Anti-laminin	2E8-s	DSHB	IgG1
anti-agrin	6D2	DSHB	IgG1
anti-fibronectin	B3/D6	DSHB	IgG1
anti-fibrillin	JC3	DSHB	IgG1

anti-perlekán	5C9	DSHB	IgG1
Anti-verszikán	12C5-s	DSHB	IgG1
anti-podokalixin	MEP21	Dr. Kelly McNagny Canada	IgG1
anti-vimentin	3B4	DSHB	IgG2A
anti-dezmin	DE-R-11	Abcam	IgG1
anti-tenaszcin-C	M1-B4	DSHB	IgG1
anti-citokeratin	Lu-5	Millipore	IgG1
anti-Von Willebrandt faktor			IgG1
Anti-Shh		DSHB	IgG1
Anti-AMV-3C2		DSHB	IgG1
csirke B-sejt marker (CXCR4)	9D9	Dr. Sonja Hartle, München University	IgG2A
csirke B-sejt marker (Bu-1b)	5-11G	SouthernBiotech	IgG1
csirke makrofág marker	TIM4	Dr. Adam Balic Roslin Institute Edinburgh	IgG1
csirke dendritikus sejt marker	CSF1R	Dr. Adam Balic Roslin Institute Edinburgh	IgG1
anti-csirke IgM	M2	Dr. Sonja Hartle, München Univ.	IgG1
CD45	HISC7	Prionics Co.	IgG2A
csirke makrofág marker	8F2	Dr. Sonja Hartle, München Univ.	IgG1
csirke makrofág marker	LEP100	DSHB	IgG1
Anti-csirke B-sejt marker	EIVE-12	Dr. Todd Pharr (USA)	IgG1
Foszfohiszton-H3	Ser10	Thermo Fisher Scientific	IgG
Kaspáz-3	5A1E	Cell Signaling	IgG

2. táblázat. Felhasznált szekunder ellenanyagok listája

Szekunder ellenanyagok	Származás	Katalógus szám
biotinilált anti-egér IgG (H+L)	BioMarker Kft.	BA-9200
biotinilált anti-egér IgM	BioMarker Kft.	BA-2020
biotinilált anti-nyúl IgG	BioMarker Kft.	BA-1000
ALEXA-488-konjugált anti egér IgG2A	Thermo Fisher Scientific	A-21131
ALEXA-488-konjugált anti egér IgG	Thermo Fisher Scientific	A-21202
ALEXA-594-konjugált anti egér IgG	Thermo Fisher Scientific	A-21203
ALEXA-594-konjugált anti egér IgG2A	Thermo Fisher Scientific	A-21135
ALEXA-594-konjugált anti egér IgM	Thermo Fisher Scientific	A-21044
ALEXA-647-konjugált anti egér IgG	Thermo Fisher Scientific	A-31571

5. *In situ* hibridizáció

In situ hibridizációt csirke SDF1-en végeztünk paraffin metszeteken digoxigeninnel jelölt ribopróbák alkalmazásával. A ribopróba szintézist és az *in situ* hibridizációt némi módosítással hajtottuk végre, ahogy azt korábban leírták (Acloque és mtsai., 2008). Röviden, a szövetet egy módosított Carnoy-fixálóval rögzítettük (etanol 60%: kloroform 30%: jégecet 10%), felszálló alkoholsoron keresztül dehidratáltuk és paraffinba ágyaztuk. Deparaffinizált és rehidrált 7 µm vastag metszeteket proteináz K-val (1 µg / ml PBT-ben, Roche) emésztettünk 10 percig 37 ° C-on, PBT-vel (0,25% Triton X-100, 0,2% szarvasmarha-szérum albumin tartalmú PBS-ben) mostuk és 4% PFA-ban utófixáltuk. A hibridizációt 70 °C-on egy éjszakán át hibridizációs pufferben (50% formamid 5x SSC, pH 4,5, 50 g/ml élesztő RNS, 1% SDS, 50 g/ml heparin) oldott digoxigeninnel jelzett próbákkal végeztük. 24 óra elteltével mosási sorozat következett 70°C-on (solution I - 50% formamid 5x SSC, pH 4,5 és solution III - 50% formamid 2x SSC, pH 4,5 oldattal), majd 1 óra 10% juhszérumban való blokkolás szobahőmérsékleten. Végül a metszeteket anti-digoxigenin ellenanyaggal (Roche) inkubáltuk egy éjszakán át. Az

előhívás BM purple AP substrate pufferben (Sigma Aldrich, 11442074001) történt 24 órán keresztül.

6. Tápoldatok és sejttenyésztések:

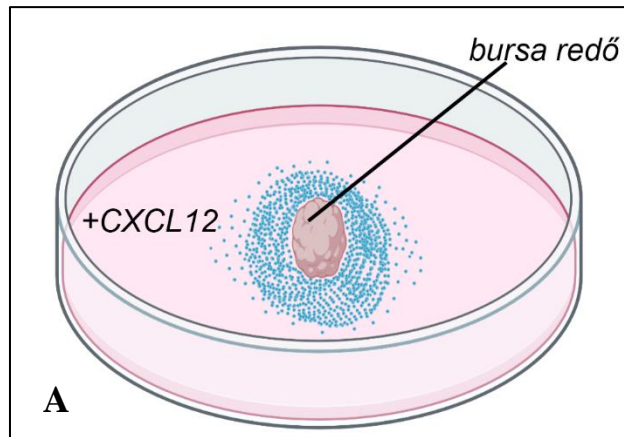
A sejttenyésztő folyamatok steril körülmények között zajlottak steril oldatokat és steril egyszerhasználatos szövettenyésztő minőségű (tissue culture tested) edényeket (Petri-csészék, Orange Scientific, cat. No. 5550200, D=60 mm) használtunk.

Sejttenyésztő/szövettenyésztő tápoldatok (médiumok), reagensek:

Alapmédiumként DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose, Sigma Aldrich, D5671-1L) és RPMI-1640 (gibco, 61870-037) típusú tápoldatokat használtam (Sigma).

6.1. B-sejtek *in vitro* migrációs kísérlete

Embrionális B sejtek tenyésztését és vándorlását 13 ED csirke embriók bursa Fabricii tenyésztésében vizsgáltuk. A szövettenyésztés első lépéseként steril fülkében sztereómikroszkóp alatt kipreparáltam a bursa Fabricii redőket. A preparálást követően a Petri-csésze aljára egy vékony csíkot karcoltam mely segítette a szervdarab letapadását (3. ábra). Annak megállapítására, hogy különböző mátrixmolekulák, hogyan befolyásolják a B-sejtek migrációját. A Petri-csészéket előzetesen laminin (10 µg/ml- Penicillin/Streptomycin tartalmú DMEM-ben hígítva), tenascin-C (10µg/ml- Penicillin/Streptomycin tartalmú DMEM-ben hígítva), illetve fibronektinnel (20µg/ml- Penicillin/Streptomycin tartalmú DMEM-ben hígítva) 37°C-on voltak előkezelve 2 órán keresztül. A tenyésztések 24 órát voltak 37 °C-on. A B-sejtek migrációját DMEM-ben oldott SDF1-el serkentettük (20µg/ml).



3. ábra. Sejtmigrációs kísérlet sémás ábrázolása. (A) Extracelluláris mátrix fehérjével bevont sejtenyésztes edény felületére kiültetett embrionális bursa Fabricii redő. A B-sejtek migrációja CXCL12 növekedési faktor hozzáadásával váltható ki.

7. A Shh-RCAS retrovírus mikroinjektálása

Vírusvektorok alkalmazásával madár embriókban is előidézhető célzott funkció-nyerő vagy funkció-vesztő mutáció. Erre alkalmasak az olyan retrovirális vektorok, amelyek madarakat megfertőző Rous-sarcoma vírusból módosított, replikáció-kompetens vírusokból (RCAS) készítenek. Az RCAS-okban az RNS a genetikai anyag és ezt egy reverz transzkriptáz, fordítja vissza DNS-re. Az RCAS vírusokba tetszőleges gének klónozhatóak önállóan vagy akár egy markergénnel együtt. A vírus embrióba történő injektálása után csak az osztódó sejtek fertőződnek meg, ahol a retrovírus beépül az újonnan keletkezett sejtek genomjába. Kísérleteinkhez a laborban előzetesen előállított, Shh-t tartalmazó, Shh-RCAS vírust használtunk (Nagy és mtsai., 2016). Korábbi kísérletek alapján ismert, hogy a Shh expressziója a tenascin-C magas mezenchimális expresszióját indukálja (Ting-Berreth és Chuong, 1996).

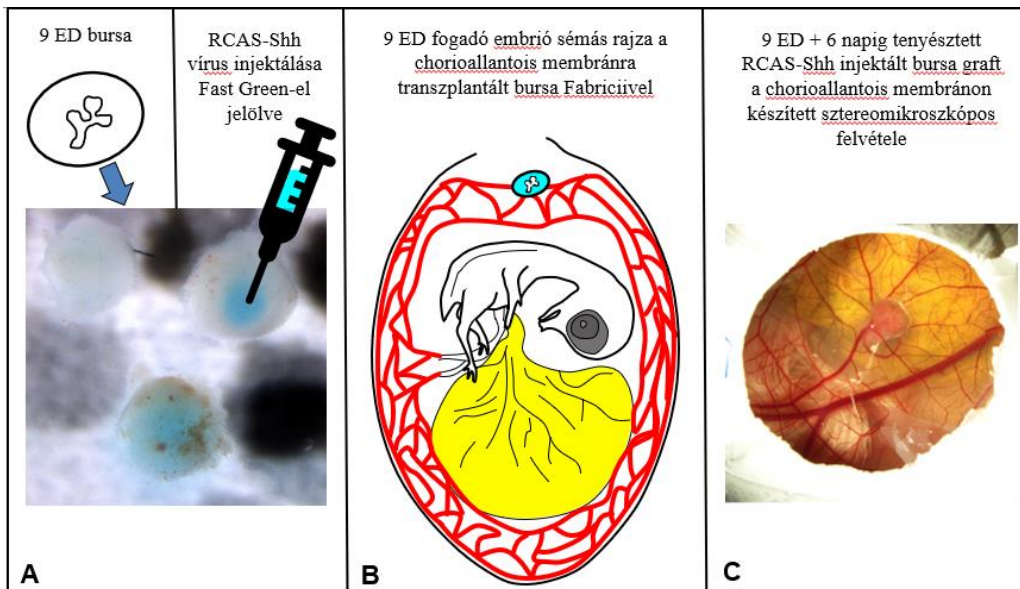
RCAS injektálása során 9 ED csirke embrió bursa Fabricijét használtuk. Narishige márkájú mikroinjektorhoz rögzített 100µl-es Hamilton fecskendő segítségével, saját készítésű vékony üvegkapillárisal, 5µl Shh-RCAS retrovírus szuszpenziót injektáltunk a bursa telepének mezenchimális rétegébe. Az injektálás előtt PBS 0.1%-os Fast Green oldatát adtuk az injektálásra előkészített oldatokhoz.

8. Chorioallantois-membrán transzplantáció (CAM)

A chorioallantois-membrán transzplantáció alkalmas módszer arra, hogy nagyobb méretű embrionális szerveket hosszabb ideig *in vivo* körülményekhez hasonló milióban tenyészünk. Kísérleteink során 9 ED csirke embriók chorioallantois-membránjára transzplantáltuk a 9 ED csirke embriókból származó bursát (4B. ábra), amely a kiültetés előtt

RCAS-Shh-val injektáltuk. A mikromanipuláción átesett embriókat 6 napig inkubáltuk (4C. ábra). A chorioallantois-membránra való helyezés lépései a következők voltak:

- 1) Bursa Fabricii epitélío-mezenchimális telepének retrovírussal történő mikroinjektálása (4A. ábra)
- 2) A fogadó embrió tojáshéját a légkamra fölött csipesszel eltávolítottuk és egy-két csepp penicillines-streptomycines PBS oldatot cseppentettünk a héjhártyára.
- 3) Ezután óvatosan egy csipesszel a héjhártyát megkarcoltuk és így könnyen eltávolíthatóvá vált.
- 4) Ekkor már látszik a chorioallantois membrán gazdagon vaszkularizált rétege ahol kiválasztottunk egy nagyobb Y elágazású artériát, melyet egy papírtörő segítségével traumatizáltuk és így az apróbb kapillárisok felszakadnak és erre a területre helyeztük az RCAS injektált graftokat.
- 5) A tojásokat átlátszó ragasztószalaggal lefedtük. A megfelelő jelölésekkel elláttuk és 6 napon keresztül a laboratóriumunk keltetőgépében, 37°C-on és 90%-os páratartalmú körülmények között, forgatórácson inkubáltuk.



4. ábra. 9 ED csirke embriónális bursa RCAS-Shh vírus injektálásának és chorioallantois-membrán transzplantációjának lépései. (A) 9 ED bursa Fabricii epitélío-mezenchimális kezdemények mikroinjektálása Fast-Green-el (kékes-zöld szín) jelzett RCAS-Shh retrovírus vektorral. (B) 9 ED embrió sémás rajza a chorioallantois-membránra transzplantált bursa Fabriciivel. Kékes-zöld szín az injektált bursát jelzi, sárgával a szikhólyag és pirossal pedig a chorioallantois-membrán van. A szerveket a tojás tompa végén felnyitott részén tettük a chorioallantois membránra. (C) Chorioallantois-membrán transzplantált bursa 6 napos tenyésztés után.

9. Elektronmikroszkópos preparátumok készítése

Az elektronmikroszkópos célra felhasznált szövetmintákat 4%-os pufferolt glutáraldehididos oldatban fixáltuk 24 órán keresztül 4 °C-on. A fixált szerveket 3-szor 5 percig mostuk Milloning pufferrel (830ml 2.26% Na₂HPO₄·2H₂O - Merck, 106462 és 170ml 2.52% NaOH – Merck, 1.06346.1000), majd a mintákat 2 órán keresztül utófixáltuk 1%-os ozmium tetraoxiddal (Merck – B000970), majd Milloning pufferrel mostunk 3-szor 5 percig. A beagyazás megkezdése előtt felszálló alkoholsorral dehidráltuk a szövettani mintákat és végül abszolút alkohollal 3-szor 20 percig dehidráltunk. Következő lépésben propilén-oxidba (Merck, 12492) helyeztük a mintákat 2-szer 5 percig, majd a propilén-oxid és EPON (Araldite Resin Grade 6005 – EMS- 10920; Poly-bed 812 – EMS- 14900; DDSA-Dodényl Succinic Anhydride-EMS- 13710; NMA-Nadic Methyl Anhydride-EMS- 19000; DMS 30-2,4,6-Tris Dimethyl aminomethylphenol-EMS-13600) gyanta keverékében 45 percig hagytuk és végül 45 percig szobahőmérsékleten tiszta EPON gyantába amit egy gumicsónakba (SPI, 2442) öntöttünk és ebbe helyeztük a szövetdarabot. A gyantába ágyazott szerveket orientáltuk és 56 °C-on 2 napig polimerizáltattuk. Metszés során először 1 µm vastag szövettani félvékony metszeteket készítettünk és toluidinkékkel festettük meg. Elektronmikroszkópiára 50-70 nm vastagságú ultravékony metszetet készítettünk. Az elektronmikroszkópos preparátumok kontrasztosítása uranil-acetát (10 percig) és ólom-citrát (12 perc) keverékével történt.

10. A metszetek kiértékelése

A metszetek vizsgálata fény-, fluoreszcens (Nikon Eclipse E800), konfokális pásztázó (Zeiss LSM 780), STED (Abberior Expert Line- Nikon Ti2) és transzmissziós elektronmikroszkóppal (Jeol JEM-1200EX) történt. A digitális kamerával készített fényképek feldolgozását ImageJ, illetve Adobe Photoshop CC 2020 programok segítségével végeztük.

11. Az adatok statisztikai elemzése

Az adatok elsődleges elemzése során normalitás- (Shapiro-Wilk) és homogenitás vizsgálatot végeztünk (Bartlett-teszt). Mivel a variancia homogenitásának feltétele nem teljesült, így a statisztikai analízis során Kruskal-Wallis tesztet, majd post hoc Dunn-tesztet (R Core Team) használtunk. A p értékek helyes meghatározása Holm-korrekcióval történt. 0.05 alatti P értékeket szignifikánsnak tekintettük. Az ábrákon az átlag standard hibáját tüntettük fel. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

VI. EREDMÉNYEK

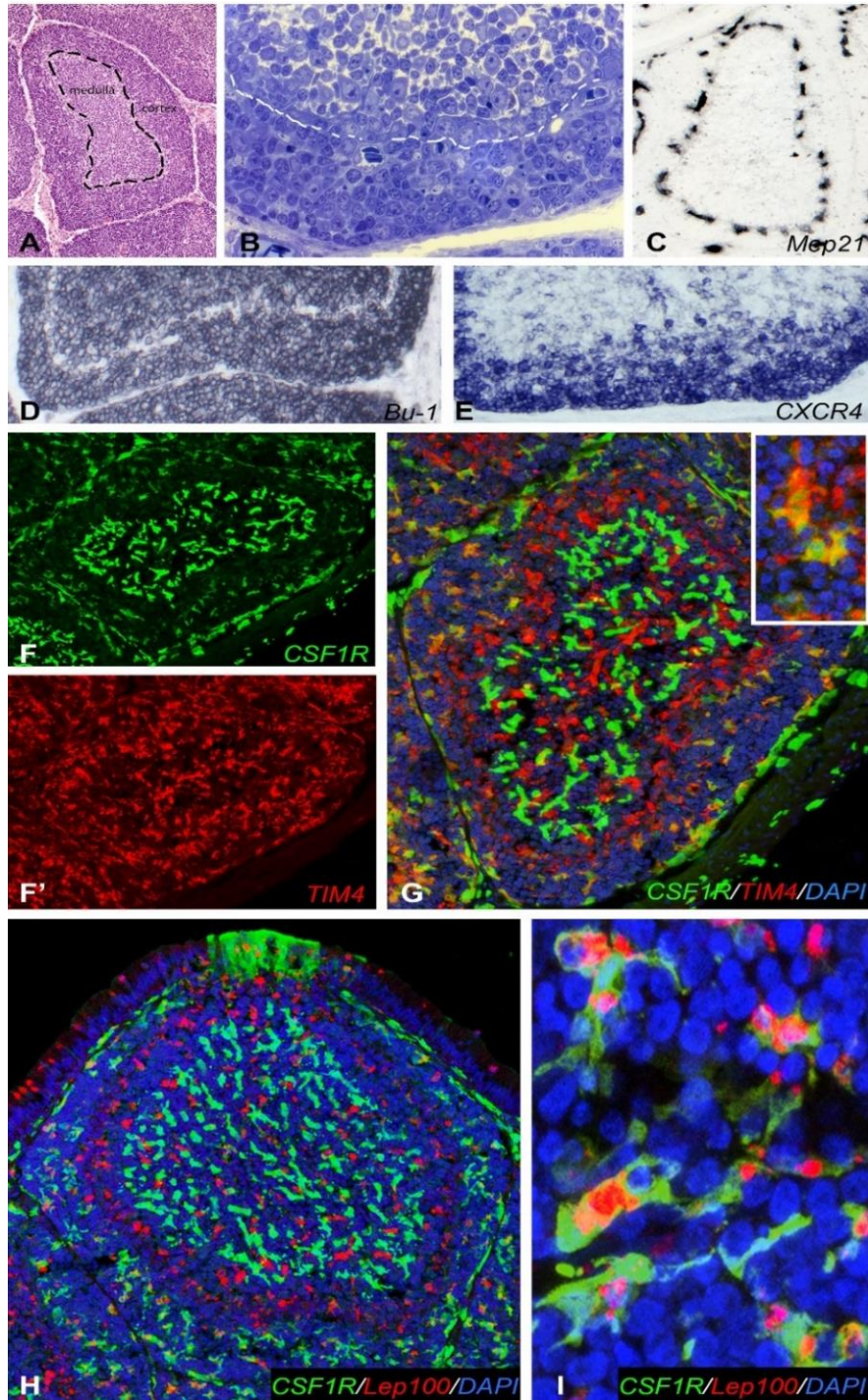
1. A kéregállomány sejtes összetétele

Kísérleteim során első lépésben a 4%-os PFA fixált 8 hetes bursa Fabricii folliculusainak hisztológiai és immuncitokémiai jellemzését végeztem el. Hematoxilin-eozin festett 7µm-es paraffinos metszeteken jól elkülönülnek a folliculusok kompartmentjei. A kéregállomány egy sokkal tömöttebb sejtes összetételt mutat, mint a lazább szerkezetű velőállomány (5A. ábra). Toluidinkékkel festett 1µm vastagságú félvékony metszeten a hematoxilin-eozin festéshez hasonló képet kapunk: a kéregállomány limfoid sejtjei tömöttebben helyezkednek el, a sejtréteget egy jól látható alaphártya határolja el a velőállománytól (5B. ábra). A bazális membrán kérgi oldalán erek találhatóak, amelyeket a tromboszint felismerő Mep21 ellenanyaggal jelöltünk (5. Ábra, C kép).

A limfoid folliculusok B-sejt populációjának jelölését specifikus ellenanyagok segítségével végeztük. A BoA1 nevű antigént (chB6/Bu-1) monoklonális ellenanyag jellegzetes sejtfelszíni festést mutat B-limfocitákon (5D. ábra). A Bu-1 molekula apoptotikus folyamatokban játszik szerepet és a madarak általános B-sejt jelölésére alkalmas (Igyártó és mtsai., 2008). Összehasonlító immuncitokémiai festésekkel igazoltuk, hogy a velőállomány és a kéregállomány B-limfocitái a Bu-1 antigénhez hasonlóan, EIV-E12 (205kDa molekulát jelöl) és CD1 pozitivitást mutatnak (nem mutatott adat), azonban csak a velőállományban lokalizálódó B-sejtek expresszálnak IgM-et. Ezzel szemben megfigyeltük, hogy a cortex B-sejt populációja CXCR4 expressziót mutat (5E. ábra). A CXCR4 molekula egy kemokin receptor, amelynek a liganduma a CXCL12 szekretált molekula.

A bursa folliculusok jellegzetes mieloid sejt típusai a szekréciós dendritikus sejtek és a makrofágok (Hu és mtsai., 2019; Nagy és mtsai., 2016; Oláh és mtsai., 2002).

A mieloid sejteket külföldi kollaborációnkban CSF1R-GFP-transzgenikus csirke törzs bursa Fabricii metszetein vizsgáltuk. A CSF1R dendritikus sejtek nyúlványos morfológiával rendelkeznek, fenotípusuk és eloszlási mintázatuk megfelel a korábban leírt vimentin+/IgG+/74.3+ sejteknek (5F. ábra) (Oláh és Nagy, 2013).



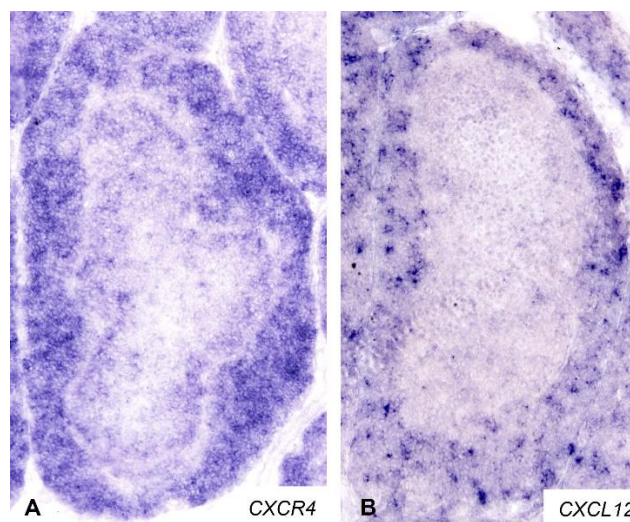
5. ábra. A bursa Fabricii folliculusok kéregállományának sejtes összetétele. (A) 8 hetes csirke bursa Fabriciiiből készített paraffinos hematoxin-eozin festett metszet. A folliculusban, a kéregállomány jól elkülöníthető a velőállománytól. (B) A kéregállomány tömörségét igazoló toluidinkék festett félvékony metszet. (C) Mep21 ellenanyaggal jelölt erek a kéregállományban lokalizálódnak. (D) Bu-1+ immunfestés a B-limfociták kéreg-, illetve velőállomány homogén eloszlását mutatja. (E) CXCR4+ sejtek a kéregállományban, csoportosulnak. (F,F') CSF1R+ dendritikus sejtek és a TIM4+ makrofágok eloszlása a bursa folliculusaiban. (G,H,I) A CSF1R+ dendritikus sejtek nem kollokalizálódnak sem a TIM4+, sem a Lep100+ makrofágokkal a velőállományban, viszont a kéregállományban a makrofág specifikus antigének ugyanazon a sejteken expresszálódnak.

A velőállományban a CSF1R expressziót mutató szekréción dendritikus sejtek nem fejezik ki a TIM4 és Lep100 makrofág markereket (5F-H. ábrák). A kérgi makrofágok CSF1R+/TIM4+/Lep100+ hármas expressziót mutatnak. Ezen felül megfigyeltük, hogy a folliculusok interfollikuláris kötőszövetében található makrofág is CSF1R+/Lep100+/TIM4+. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a velőállományban egy jól elkülönült dendritikus sejt és makrofág populáció található, míg a kéregállományban egy CSF1R+/TIM4+/Lep100+ makrofág populáció van jelen, de dendritikus sejt nem mutatható ki. (5H,I. ábrák).

A folliculusokban található makrofágok specifikus azonosítására a Lamp1 lizoszomális proteinek felismerő Lep100 nevű ellenanyagot, illetve TIM4 ellenanyagot használtunk (Balic és mtsai., 2019). Kettős immunfluoreszcens festéssel látható, hogy a velőállomány és a cortex területén nagy számban vannak jelen Lep100 pozitivitást mutató CSF1R+ makrofág morfológiájú sejtek (5H. ábra). A TIM4 (Foszfatidil-szerin receptor T-sejt immunglobulin és mucin domént tartalmazó 4) pozitivitást mutató sejtek fagocitózisra képesek és ez a molekula kolokalizálódik a kérgi CSF1R+/Lep100+ sejtekkel (5G. ábra).

A folliculusok mieloid sejtjeinek vizsgálata során kimutattuk, hogy a kéregállomány szekréción dendritikus sejteket nem tartalmaz, de kérgi makrofág populációval rendelkezik.

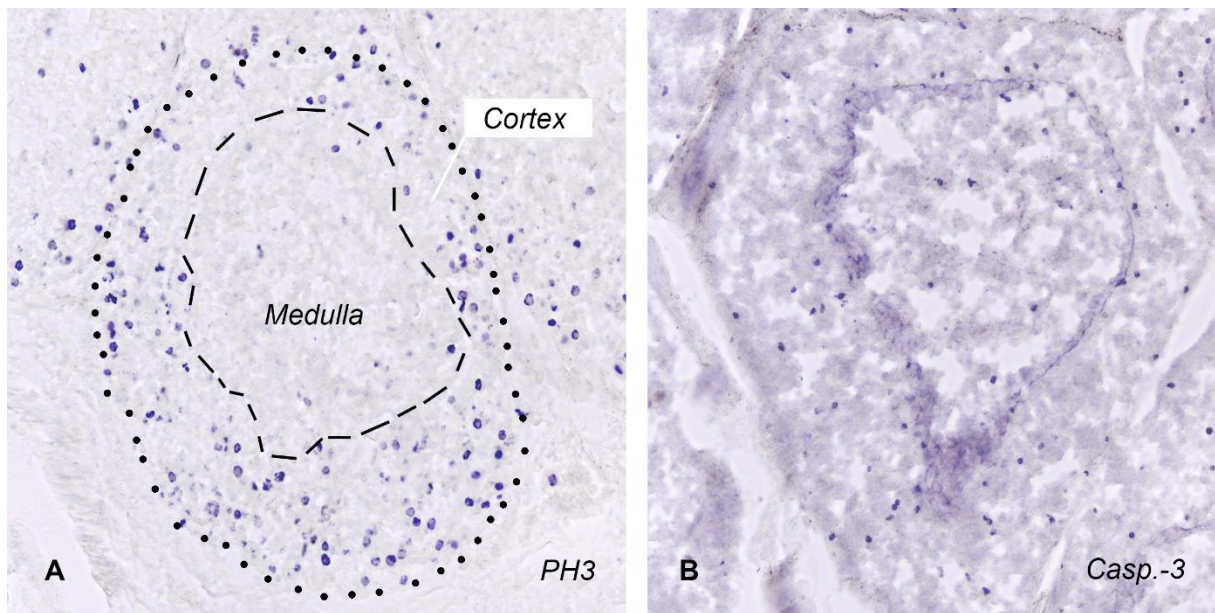
In situ hibridizációval is igazoltuk, hogy a CXCR4+ sejtek a kéregállományban lokalizálódnak. A CXCR4 receptor ligandja, a CXCL12 (SDF1) molekula, szintén a folliculusok kéregállományában fejeződik ki.



6. ábra. A CXCR4-CXCL12 molekulák expressziós mintázata. (A) A migrációban fontos szerepet betöltő CXCR4 receptor molekula expressziója kizárólag a kéregállományban

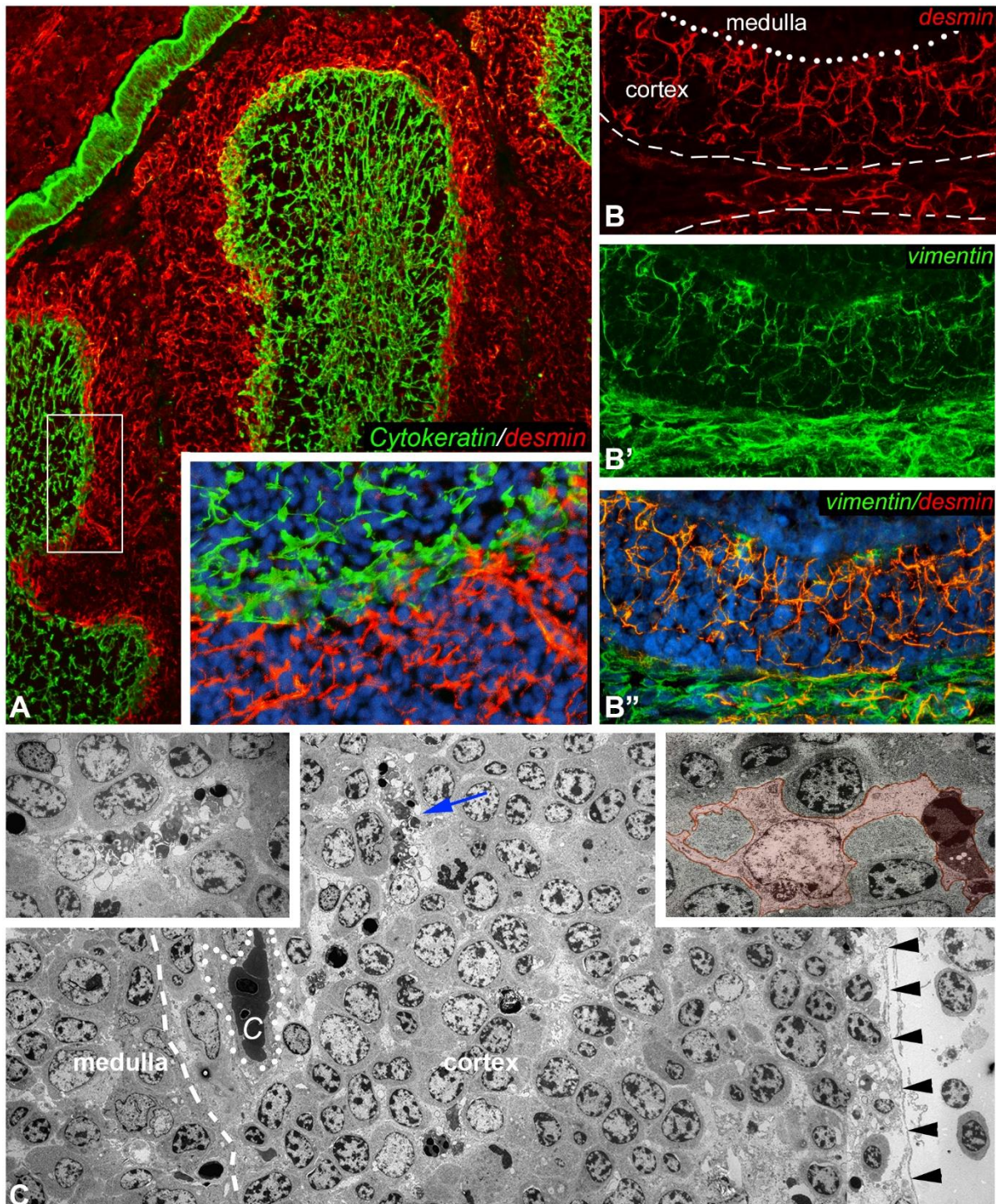
figyelhető meg. **(B)** A CXCR4 molekula ligandja a CXCL12 hasonlóan kérgi kifejeződést mutat.

Az osztódó sejteket a foszfohiszton-3 pozitivitás alapján mutattuk ki. A proliferáló sejtek összehasonlító analízise során kiderült, hogy a kéregállomány intenzívebb osztódása figyelhető meg a velőállománnyal szemben. Ezzel ellentétben, kaszpáz-3 ellenanyag alkalmazásával egyenletesen elszórtan találunk apoptotikus sejteket a folliculusokban.



7. ábra. Sejosztódás és sejtpusztulás összehasonlítása 5 hetes felnőtt egyed folliculusaiban (A) PH3=foszfohiszton-3 jelölt osztódó sejtek és a (B) Casp.-3=kaspáz-3 jelölt apoptotikus sejtek eloszlási mintázata.

Elektronmikroszkópos vizsgálattal korábban már igazolták, hogy a folliculus kéreg- és velőállománya különböző retikuláris szerkezettel rendelkezik (Nagy és mtsai., 2004). A velőállomány hámretikuluma citokeratin+, a kéregállomány pedig mezenchimális retikulummal rendelkező dezmin+/vimentin+ sejtek komplex hálózata (7A-B". ábrák): a dezmin csak a kérgi retikulumsejtekben fejeződik ki, míg a vimentin az interfolliculáris septum kötőszövetét is jelöli. A bursa folliculusnak nemcsak a limfo-mieloid populációja eltérő, hanem a strómája is. Ez a két kompartment embrionálisan is eltérő eredettel rendelkezik: a velőállomány ektodermális, míg a kéregállomány mezodermális eredetű (Nagy és mtsai., 2010). Elektronmikroszkópos módszerrel fagocitózisra utaló, lizoszómákat tartalmazó sejteket és mezenchimális retikulum sejteket különböztetünk meg (7C. ábra).

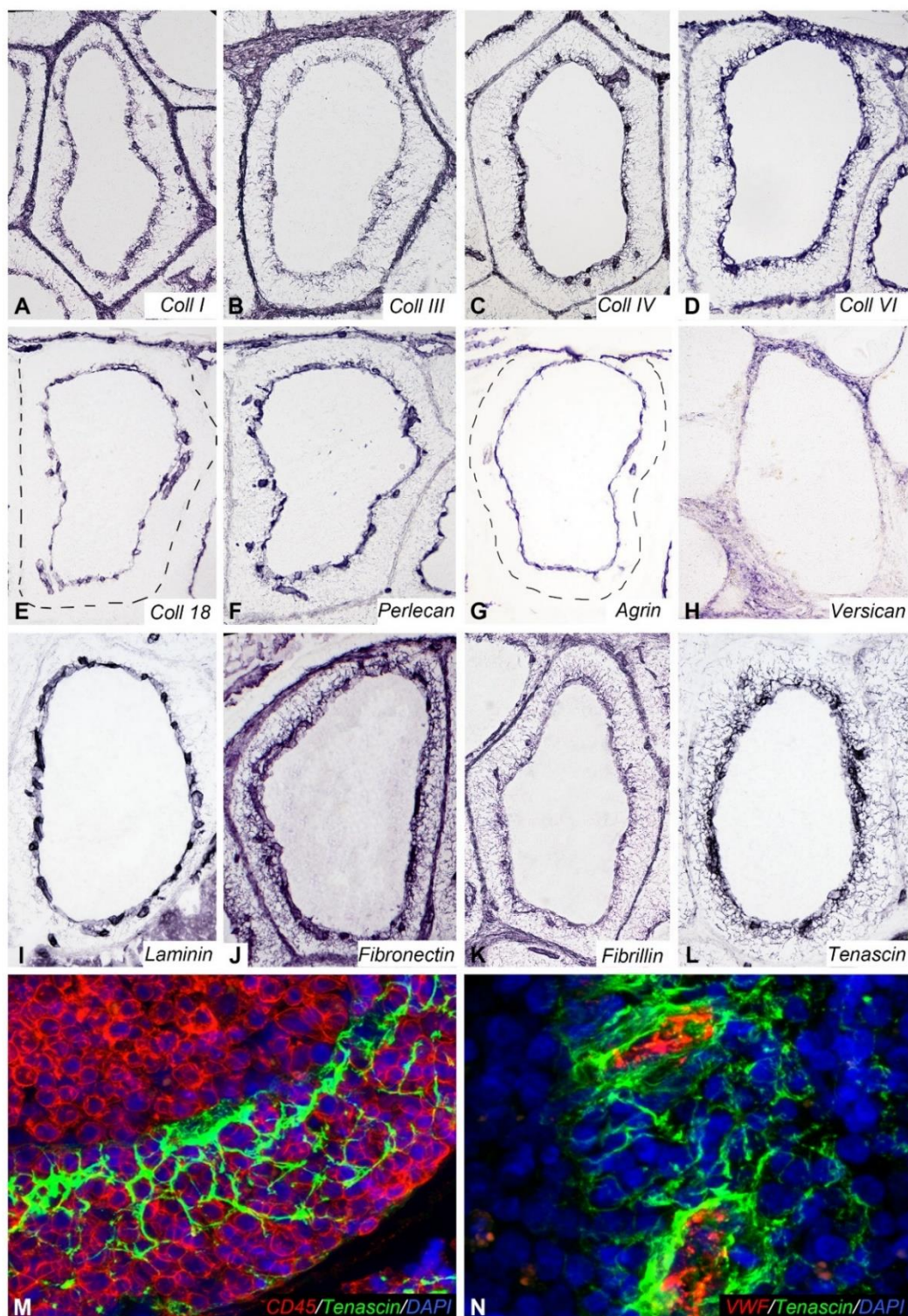


8. ábra. A kéregállomány és a velőállomány különböző retikuláris szerkezete.

(A,B,B',B'') Cytokeratin+ hámretikulum a velőállományban, desmin+/vimentin+ mezenchimális retikuláris sejtek a kéregállományban alkotják a folliculus vázrendszerét. (C) A folliculus kéregállományának elektronmikroszkópos képe: a makrofág sejtek (bal felső beillesztett kép a C kép kék nyíllal megjelölt területe) elkülönülnek a retikulum sejtektől (jobb oldal beillesztett kép). A retikulum sejtek magszerkezete (eukromatikus mag) eltér a limfoid és mieloid sejtek heterokromatikus magszerkezetétől, szaggatott vonal a kéreg-velő határon futó epitél sejtréteg alaphártyájának helyét jelöli. A kapillarisok (c) a kéreg belső területére lokalizálódnak. A kéreg interfollikuláris szeptum felé eső határát fekete nyílhegyek jelölik.

2. A kéregállomány extracelluláris mátrix molekulái

A kéregállomány vázrendszerét alkotó stromális sejtek tulajdonsága, hogy intenzíven termelnek extracelluláris mátrix (ECM) molekulákat és részt vesznek a kéreg jellegzetes mikrokoznyezetének kialakításában. A mezenchimális retikuláris sejtek által termelt ECM kollagénekből, proteoglikánokból, valamint glikoproteinek csoportjába tartozó molekulákból tevődik össze (9. ábra). A kollagének közül a kollagén I, kollagén III, kollagén IV, kollagén VI-ot választottuk ki, amelyek a kéregállományban egy finom hálózatot és az interfollikuláris kötőszövetet jelölik. A proteoglikánokat két fő csoportra osztottuk, a heparán-szulfát proteoglikánok (kollagén XVIII, perlecan, agrin) a bazális membránt, az interfollikuláris teret és az ereket jelölik, míg a kondroitin-szulfát proteoglikánok csak az interfollikuláris térben expresszálódnak (9E-H. ábrák). A glikoproteinek közül a laminin, fibronectin, fibrillin, tenascin-C expresszióját vizsgáltuk. Tenascin-C kiemelten csak a kéregben van, nem expresszálódik interfollikuláris szeptumban. Von Willebrandt faktor és tenascin-C kettős fluoreszcens festése a tenascin-C expressziót az erekhez asszociáltan nagyobb koncentrációban mutatta ki (9N. ábra).

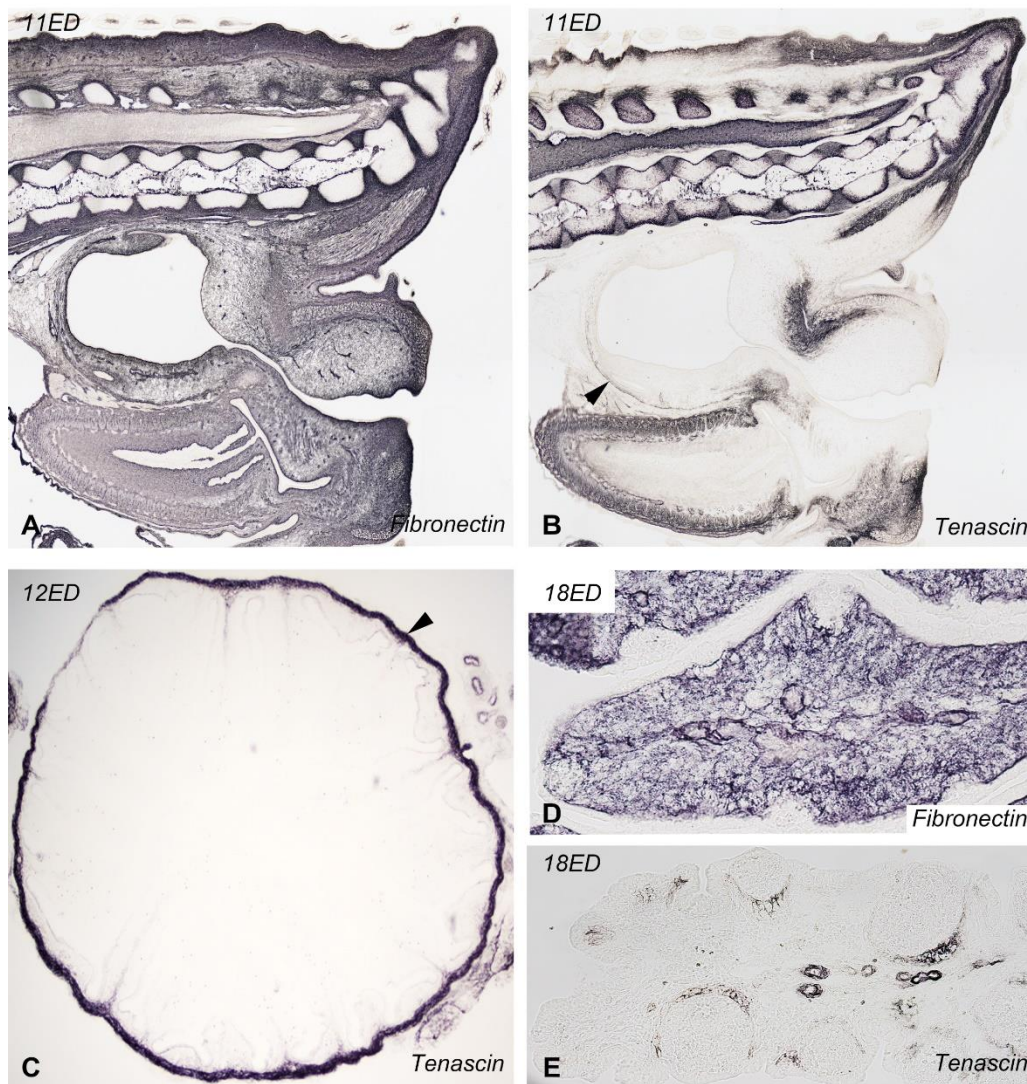


9. ábra. A bursa folliculusok kéregállományra jellemző extracelluláris mátrix eloszlási mintázata.

(A-D) Kollagének. (E-H) Proteoglikánok. (I-L) Glikoproteinek. (M) Tenaszcin-C a kéregre jellemző expressziót mutat. A CD45 immunreakció a leukociták homogén eloszlását mutatja. (N) Von Willebrandt faktor expresszió (piros) az ereket jelöli, amelyet a kéregre jellemző tenaszcin-C extracelluláris mátrix molekula ölel körül.

3. A kéregállomány embrionális kialakulása

A bursa folliculusok kéregállományának kialakulását az embrionális fejlődés különböző stádiumaiban követtük nyomon. Mivel a folliculuskezdemények B-sejt prekursorokkal történő kolonizációja az embrionális fejlődés 10-15. napjai közé tehető, az extracelluláris mátrix immuncitokémiai karakterizálását 11, 12, 15 és 18 napos embriókban végeztük el.



10. ábra. A kéregállomány megjelenése az embrionális fejlődés során. (A) 11 ED csirke embrióban a fibronectin homogén expressziót mutat. **(B)** Tenaszcin-C+ nem fejeződik ki a bursa mezenchimájában. **(C)** 12 ED csirke embrióban a bursa kötőszöveti tokját intenzív tenaszcin-C expresszió jellemzi. **(D,E)** 18 ED csirke embrióban a fibronectin expresszió

homogén eloszlást mutat és tenaszcin-C⁺ sapkaszerűen megfigyelhető a folliculus kezdemények körül.

Korábbi ismeretek alapján a bursa Fabricii folliculus kéregállományának kialakulása a kikelés utánra tehető. 11-12 napos embriók epitélío-mezenchimális bursa telepében intenzív fibronectin expresszió figyelhető meg (10A. ábra). Laminin, agrin, kollagén 18 a kéreg-velő határ alatt húzódó alaphártyát rajzolta ki (nem mutatott adat). A 9. ábrán bemutatott ECM fehérjék komparatív immunfestésével igazoltuk, hogy a tenaszcin-C kivételével valamennyi vizsgált molekula kifejeződik a bursa mezenchimájában. Tenaszcin-C expresszió csak a bursa tokját alkotó kötőszövetben volt kimutatható (10B,C. ábra). Kikelés előtt 3 nappal, a 18 napos csirke embrió bursa Fabricii mezenchimális területe továbbra is intenzív fibronectin expressziót mutatott (10D. ábra). Ebben a fejlődési stádiumban tudunk először tenaszcin-C expressziót megfigyelni, ami a fejlődő folliculusbimbókat körülvevő sapka-szerű immunreaktivitást mutatott.

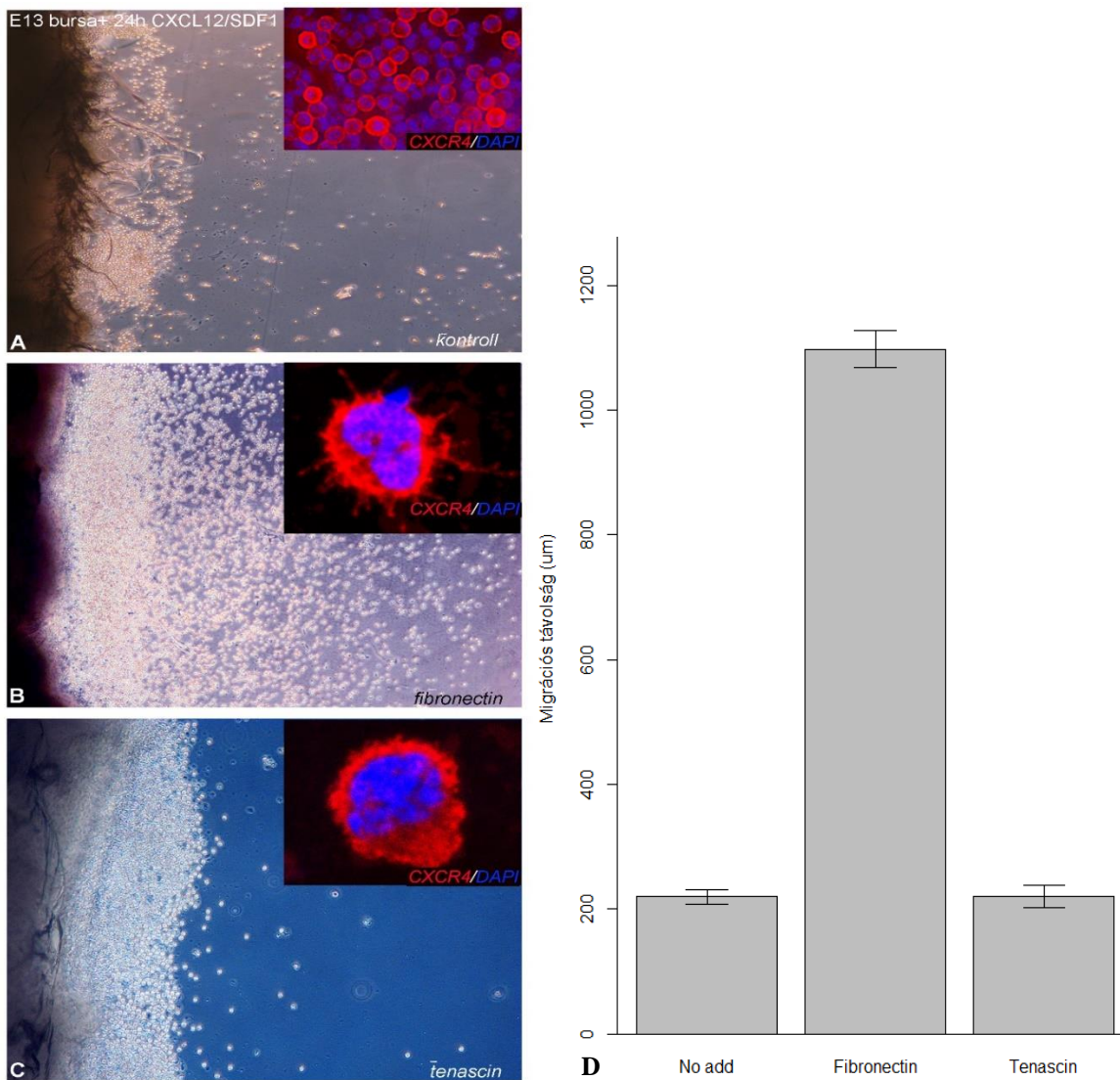
4. Tenaszcin-C gátolja a B-sejt prekurzorok migrációját

Az extracelluláris mátrix összetevői komplex kölcsönhatásban állnak egymással és sejtfelszíni receptorokkal, ami elengedhetetlen az őssejtek letapadásához, migrációjához és differenciálódásához.

In vivo és *in vitro* adatok alapján a fibronectin típusú extracelluláris mátrix molekulának kulcsszerepe van a B-sejtek migrációjában; a Bu-1⁺ B-limfocita prekurzorok integrinek segítségével a fibronectinhez tapadva vándorolnak a bursa mezenchimájába (Palojoki és mtsai., 1993). A CXCR4⁺ B-limfociták felszíni morfológiája megváltozik attól függően, hogy milyen extracelluláris mátrix molekulával vontuk be a Petri-csésze alját *in vitro* migrációs kísérletek során. Ha a Petri-csésze alját nem kezeltük, akkor a limfocita felszíne kerek morfológiát mutatott, de ha bevontuk fibronectinnel, akkor a limfocita felszínén kifejezett tüske-szerű membrán-nyúlványok jelentek meg. Tenaszcin-C-vel bevont felület esetén hasonló morfológiát mutatott azzal, amely esetén nem vontuk be a felszínt. Statisztikailag összehasonlítva ezeket a kísérleti eredményeket azt láttuk, hogy a fibronectinnel bevont felület szignifikánsan megváltoztatta a migrációs távolság mértékét. A tenaszcin-C sejt migrációra közvetített hatása szignifikáns csökkenést mutatott a fibronectinnel szemben, amivel azt bizonyítottuk, hogy a tenaszcin-C barrierként működik, azaz gátolja a migrációt.

A bursa kéregállománya specifikus tenaszcin-C sejt migrációra kifejlett hatását 13 napos csirke embriókból izolált bursa redők *in vitro* tenyésztésében tanulmányoztuk a korábbi,

CXCL12 indukált módszerrel (Nagy és mtsai., 2020). A kísérlet során, extracelluláris mátrix molekulával nem kezelt (11A. ábra) kontroll, fibronectin-kezelt (11B. ábra) és tenascin-C-vel bevont felszínre (11C. ábra) transzplantált bursa redőket CXCL12 kemokint tartalmazó tápoldatban tenyésztettünk. 24 órával a tenyésztés után fibronectin-felszín esetében intenzív sejtmigráció volt megfigyelhető, ahol a CXCR4⁺ B-sejt prekurzorok felszínén jellegzetes nyúlványok jelentek meg (11B. ábra). Ezzel szemben, tenascin-C-el bevont felszínre explantált bursa redőkből nem vándorolnak ki a sejtek. A kiültetett bursa redő közelében található tömött sejtrétegből sok CXCR4⁺ sejt található, aminek felszíne apró bolyhokkal tagolt (11C. ábra - fluoreszcens beillesztett felvétel).

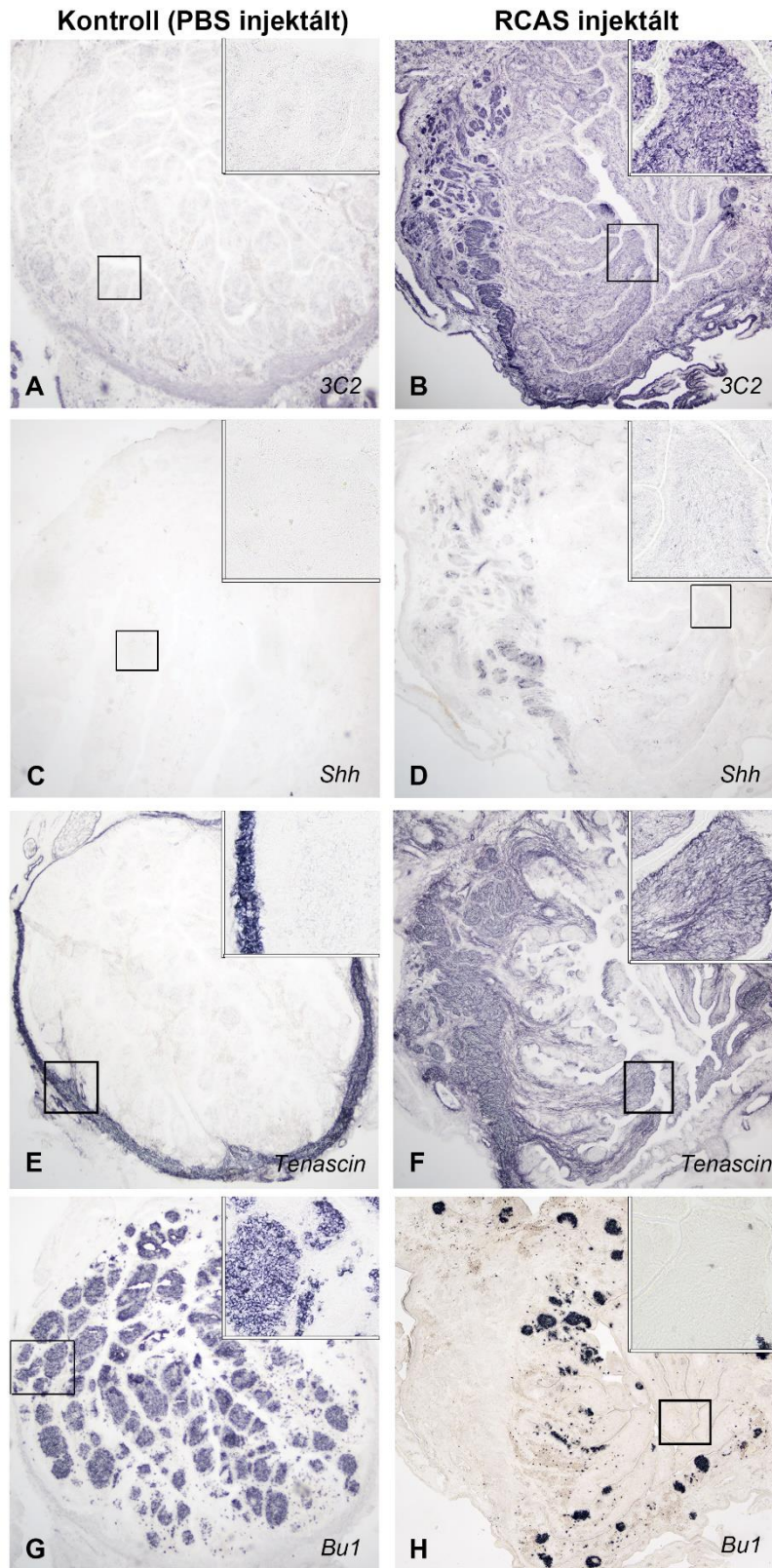


11. ábra. SDF1 molekulával indukált sejtmigráció. (A) A kontroll 13 ED csirke bursa Fabricii redő műanyag sejtenyésztő edény nem kezelt felszínére kiültetve 24 h tenyésztés után. A sejtenyésztő tápoldat CXCL12 migrációt elősegítő kemokint tartalmazott. (B) Fibronectinnel bevont Petri-csészén végzett sejtmigrációs kísérlet 24 h tenyésztés után SDF1 hozzáadásával. (C) Tenascin-C-vel bevont Petri-csészén végzett sejtmigrációs kísérlet

24 h tenyésztés után CXCL12 hozzáadásával. **(D)** A sejtek migrációs távolságának statisztikai elemzése csoportonként, a szórás az átlag standard hibájaként van feltüntetve.

A legújabb genetikai vizsgálatok olyan jelátviteli utakat tártak fel, amelyek a gerincesek fejlődése során összehangolják a mezenchimális növekedési faktorok expressziós mintázatát és az extracelluláris mátrix kapcsolatát. A Sonic hedgehog egy fontos sejtek közötti kommunikációban szerepet játszó morfogén, ami a gerinces központi idegrendszerben polarizált sejtorsók kialakulásáért (Echelard és mtsai., 1993; Krauss és mtsai., 1993), a szomiták, a bélcsatorna (Fan és Tessier-Lavigne, 1994; Nagy és mtsai., 2016) és a végtagok kialakulásáért felelős. A Sonic hedgehog molekula normál körülmények között a bursa Fabricii-ben nem expresszálódik (Nagy és mtsai., 2010). A Sonic hedgehog jelátvitel, kísérletes aktiválása a tollkezdemény mezenchimális állományában ektópikus tenaszcin-C expressziót eredményezett (Ting-Berreth és mtsai., 1996). Ezt a módszert alkalmazva 9 napos embrió bursa Fabricii mezenchimális rétegét RCAS-Shh retrovírussal fertőztük és 9 napos csirke embrió chorioallantois membránjára transzplantáltuk. Arra kerestük a választ, hogy a tenaszcin-C rendellenesen megjelenő korai expressziója hogyan befolyásolja a folliculusok B-sejtes kolonizációját. Chorioallantois membrán tenyészetek 6 napos inkubálása után fixált graftokat immuncitokémiai módszerekkel tanulmányoztuk. 9 napos embrió RCAS-Shh retrovírus vektorral történő ektópikus Shh-t kísérő magasabb tenaszcin-C expressziót eredményezett (12A-F. ábrák).

Chorioallantois-membránra transzplantált kontroll bursa esetében a folliculuskezdemények B-sejtes kolonizációja megtörténik, normál méretű folliculusok alakultak ki, a tenaszcin-C csak a bursa kötőszöveti tokjába lokalizálható (12E,F. ábrák). Shh túlexpresszáltatás esetén a B-sejtek kolonizációjának zavara együtt jár a mezenchimális tenaszcin-C expresszió megjelenésével (12G,H. ábrák). Feltételezzük, hogy a tenaszcin-C expresszió miatt a folliculusbimbók iniciálása és B-sejtes kolonizációja nem történik meg.



12. ábra. Tenascin-C expresszió indukálása RCAS-Shh retrovírus injektált bursa Fabriciiben. (A,B) 3C2 ellenanyag az RCAS vírus tokfehérjét jelöli. (C,D) Shh ellenanyaggal a sonic hedgehog expresszióját mutatja. (E,F) Tenascin-C molekula rendellenes kifejeződése a bursa mezenchimában. (G,H) Bu-1+ B-limfociták és folliculusok komparatív eloszlása a kontroll és RCAS-Shh fertőzött bursa Fabriciiben.

VII. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Szaktervezési munkámban a bursa Fabricii limfoid folliculusok kéregállományának sejtes és molekuláris összetételét, illetve fejlődését vizsgáltuk. Kiemelt célunk a kéregállomány szövettani, morfológiai vizsgálata, a mezenchimális retikulum sejtek által termelt extracelluláris mátrix meghatározása és a kéregállomány ontogenezisének feltárása volt.

A bursa Fabricii szöveti szerkezetének tanulmányozása során megfigyeltük, hogy a velőállomány és a kéregállomány külön kompartmentként van jelen és különböző szöveti szerkezetet mutat. A velőállomány, eltérően a kéregtől, limfocitákkal tömöttebb szerkezetű, amihez társul, hogy a bursa B-sejtek populációja két alpopulációra osztható. A velőállomány Bu-1+/IgM+/CXCR4- B-sejteket tartalmaz (Funk és mtsai., 1997; Nagy és mtsai., 2020; Ratcliffe és mtsai., 1986), míg a kérgi B-limfocita populációja Bu-1+/IgM-/CXCR4+ sejtekből áll (Nagy és mtsai., 2020). A limfoid populációkban prezentált eltéréshez hasonlóan az immunocitokémiai vizsgálatok alapján különbséget mutattunk ki a kéreg és a velő között, így eltérő sejttípusokat azonosítottunk. Jól ismert, hogy a velőállomány makrofág és dendritikus sejtpopulációval is rendelkezik, ahol a vimentin+/IgG+ dendritikus sejtek CSF1R+. Korábbi tanulmányok TIM4 és Lep100 antigént expresszáló makrofág sejtpopulációkat azonosítottak. Kettős immunfluoreszcens festések, illetve CSF1R-GFP transzgenikus madarak bursa Fabricii analízise során, elsőként igazoltuk, hogy a dendritikus sejtek nem fejezik ki a makrofágra jellemző Lep100 és TIM4 molekulákat. Ezzel szemben a kortikális makrofág populáció CSF1R+/TIM4+/Lep100+ pozitivitást mutatott.

Szintén kettős immunfluoreszcens festésekkel először igazoltuk, hogy a vimentin+, illetve dezmin+ sejtek ugyanazt a sejttípust jelentik, amit mezenchimális retikuláris sejtekként határoztunk meg. Részletes immunfestésekkel igazoltuk, hogy a kérgi mezenchimális eredetű retikuláris sejtek nagymértékben termelnek extracelluláris mátrixfehérjéket. Ez a mátrix gazdag kollagénekben, heparán-szulfát proteoglikánokban, kondroitin-szulfát proteoglikánokban és glikoproteinekben ellentétben a velőállománnyal, ahol nincs kimutatható extracelluláris mátrixfehérje. Az extracelluláris mátrixfehérjék között kiemelkedik a kéregben, a tenascin-C molekula amely specifikusan expresszálódik. A tenascin-C expressziós gradiens mintázatot mutat a kéregben, sűrűbben rendeződik a cortico-medullaris határrégióban, ahol a kapillárisok találhatóak. Konfokális mikroszkópon kapott eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a tenascin-C gradiens-szerű elrendeződése a B-sejtek irányított migrációját szabályozza.

Ezt támasztja alá a tenascin-C késői expressziója is, amely először az embriogenezis 16. napján figyelhető meg, amikor irodalmi adatok szerint a folliculusok B-sejtes kolonizációja lecseng. Az embrionális fejlődés 18. napján jól látható, hogy tenascin-C „sapkát” képez a folliculusbimbók körül, ott ahol kialakul a folliculáris kérgi kompartment. Eredményeink cáfolják azt a korábbi feltételezést miszerint a kéregállomány a kikelés után alakul ki.

In vitro kísérletekből nyert eredményeim rávilágítanak a tenascin-C fehérje B-sejt migrációt szabályozó funkciójára. Amikor fibronectinnel bevont felületen CXCL12 jelenlétében embrionális bursa Fabricii redőket tenyésztettünk, a CXCR4+ B-sejtek sokkal tovább vándoroltak, mint a tenascin-nal bevont vagy a mátrix-fehérjével nem kezelt felületen. Ezekben a tenyészetekben a B-limfociták sejtfelszíni morfológiájának jelentős megváltozását észleltük STED mikroszkópia alkalmazásával. A fibronectinnel bevont felületen kivándorolt CXCR4+ sejtek felszíne kifejlett membrán-tüskékkel rendelkezett, a tenascin-nal bevont sejtek kerek morfológiát mutattak. Feltételezzük, hogy a tenascin minden bizonnyal gátolja a migrációt, hiszen így a sejtek „guruló” mozgása nem jöhet létre az integrinek segítségével. A tenascin és fibronectin B-sejtek vándorlására gyakorolt hatását emlős limfocita tenyészetekben is megfigyelték. A B-sejtek szövetekben leírt „guruló” mozgását a fibronectin serkentette, tenascin gátolta.

In vitro kísérletek során tett megfigyeléseinket alátámasztják az *in vivo* embriomanipulációs adatok. Amikor sonic hedgehog retrovirális transzfekciójával tenascin-C expressziót indukáltunk a bursa telep mezenchimájában, akkor az ektopikus tenascin expresszió gátló hatása rendellenes kolonizációt és a fejletlen B-sejtes folliculus kialakulását eredményezte. Feltételezzük, hogy a bursa Fabricii fejlődése során a mezenchimális telep magas fibronectin tartalma és a tenascin hiánya teszi lehetővé a szerv B-sejt prekursorokkal történő kolonizációját.

Összefoglalva hisztológiai módszerekkel részletesen jellemeztük a bursa limfoid folliculusok kéregállományának szöveti szerkezetét. Kimutattuk, hogy a kéregben gazdag extracelluláris mátrix található és ezek közül a tenascin-C specifikusan a kéregre jellemző. A kéregállomány kialakulását tekintve kimondhatjuk, hogy a kikelés előtt 5 nappal megkezdődik. Embriionális és embriomanipulációs kutatásaink igazolják, hogy a tenascin-C gátolja a B-sejt prekursorok migrációját.

További embriomanipulációs (sorstérképezés, BrdU-jelölés) és sejtbiológiai (sejt szeparáló, RNAseq) kísérleteket tervezünk a kérgi limfociták részletes karakterizálására.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A bursa Fabricii a madarak primer nyirokszerve, amelynek szerkezeti és működési alapegységeiben, a limfoid folliculusokban zajlik a B-sejtek proliferációja és differenciálódása. A folliculusok két, szövettanilag és fejlődéstanilag jól elkülönült kompartmentből, az ektodermális eredetű velőállományból és a mezodermális eredetű kéregállományból állnak. Annak ellenére, hogy a B-sejtek éréshez szükséges folliculáris velőállomány szövettana részletesen karakterizált, az ontogenetikailag később megjelenő kortikális régió szöveti és molekuláris összetétele nem ismert.

Szakedolgozati munkám során a bursa Fabricii folliculusok kéregállományának sejtszintű és molekuláris elemzését végeztük immuncitokémiai és hisztológiai módszerekkel, kiegészítve sejtenyésztési és embriómanipulációs technikákkal.

A IgM⁺ molekulákat kifejező medulláris B-sejtekkel ellentétben a kéreg B-sejtjei CXCR4 pozitívak, viszont IgM-et nem expresszálnak. A folliculáris kéregállományban dendritikus sejt nem található, viszont CSF1R⁺/TIM4⁺/Lep100⁺ makrofágok egyenletesen előfordulnak. A limfo-mieloid sejtekben gazdag kortex alapvázát dezmin és vimentin kifejező kérgi retikulumsejtek alkotják, amelyek kollagén (I-es típusú, III-, IV-, VI típusú), glikoprotein (laminin, fibronectin, fibrillin, tenascin-C), illetve proteoglikánokban gazdag ECM hálózatot termelnek. Az ECM részletes karakterizálás során azt találtuk, hogy míg a mátrix fehérjék többsége korai embrionális bursában is kifejeződik, addig a tenascin-C expressziója először csak a kikelés táján, a 16-18 napos embrió folliculuskezdeményei körül figyelhető meg. A kikelést követően a kéregállományra specifikus tenascin-C, jellegzetes eloszlást mutatva a kapillárisok körül koncentrálódik. A tenascin-C funkciójának *in vitro* vizsgálata igazolta, hogy a B-sejtek migrációja szempontjából gátló környezetet képvisel. *In vivo* RCAS-Shh retrovírus vektor által előidézett tenascin-C túlexpresszáltatás is gátolja a fejlődő folliculusok B-sejtes kolonizációját.

Eredményeimet összefoglalva kijelenthetjük hogy 1.) a kéregállomány fejlődése a kikelés előtt 5 nappal megkezdődik. 2) a kéregállomány B-sejt populációja Bu-1⁺/CXCR4⁺/IgM⁻ expressziós mintázatot mutat és CSF1R⁺ dendritikus sejteket nem tartalmaz, viszont rendelkezik egy CSF1R⁺/TIM4⁺/Lep100⁺ makrofág populációval. 3) a kéregállomány vázrendszerét mezenchimális retikulum sejtek képezik, amelyek tenascin-C-ben gazdag extracelluláris mátrixot termelnek. 4) *In vivo* és *in vitro* kísérletek szerint a tenascin-C gátló környezetet jelent a vándorló B-sejtek számára.

IX. SUMMARY

The bursa of Fabricius is the primary lymphoid organ of birds, where B-cell proliferation and differentiation takes place in the follicles, which is the basic structural and functional units. The follicles are composed of two distinct compartments, the ectodermal-derived medulla and the mesodermal-derived cortex. Although the histology of the follicular medulla required for B-cell maturation has been characterised in detail, the tissue and molecular composition of the ontogenetically later emerging cortical region is not known.

In my thesis work, cellular and molecular analysis of the follicular cortex was performed by immunocytochemical and histological methods, supplemented by cell culture and embryo manipulation techniques.

In contrast to medullary B-cells expressing IgM⁺ molecules, cortical B-cells are CXCR4 positive but do not express IgM. No dendritic cells are present in the follicular cortex, although CSF1R⁺/TIM4⁺/Lep100⁺ macrophages are evenly distributed. The lympho-myeloid cell-rich cortex is underpinned by cortical reticulum cells expressing desmin and vimentin, which produce a network of collagen (type I, type III, IV, VI), glycoprotein (laminin, fibronectin, fibrillin, tenascin-C) and proteoglycan-rich extracellular matrix. Detailed characterization of the extracellular matrix revealed that while most of the matrix proteins are expressed in the early embryonic bursa, the expression of tenascin-C is first observed 4-5 days before hatching. After hatching, cortical-specific tenascin-C is concentrated around the capillaries. *In vitro* studies of the function of tenascin-C have demonstrated that it represents an inhibitory environment for B-cell migration. Similarly, *in vivo* RCAS-Shh retroviral vector-induced overexpression of tenascin-C inhibits B-cell colonization of developing follicles.

In summary, 1) development of the follicle cortex starts at 5 days before hatching; 2) the B-cell population of the cortical follicle shows a specific Bu-1⁺/CXCR4⁺/IgM⁻ expression pattern, and the follicle lacks CSF1R⁺ dendritic cells and has a CSF1R⁺/TIM4⁺/Lep100⁺ macrophage population. 3) The scaffold of the cortical tissue is composed of mesenchymal reticulum cells that produce a tenascin-C rich extracellular matrix. 4) *In vivo* and *in vitro* experiments show that tenascin-C provides an inhibitory environment for B cell migration.

X.HIVATKOZÁSOK

Abbate F., Pfarrer C., Jones C. J. P., Ciriaco E., Germanà G. és Leiser R. (2007): **Age-dependent changes in the pigeon bursa of Fabricius vasculature: A comparative study using light microscopy and scanning electron microscopy of vessel casts.** *Journal of Anatomy.* 211, 3.: 387–398.

Abdou N., és Abdou N. (1972): **Bone Marrow : The Bursa Equivalent in Man** *American Association for the Advancement of 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 csflr-expressing epithelial cells are the functional equivalents of mammalian m cells in the avian follicle-associated epithelium.** *Frontiers in Immunology.* 10: 1–16.

Bódi I., Minkó K., Fölker O., Benyeda Zs., Felföldi B., Magyar A., Kiss A., Palya V. és Oláh I. (2018): **Expression of caveolin-1 in the interfollicular but not the follicle-associated epithelial cells in the bursa of fabricius of chickens.** *Journal of Morphology.* 279, 1.: 17–26.

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 By M. A. X. D., és Petersont R. D. A. (1965): **NATURE 143.** *Nature.* 205: 143–146

Dascher C. C. (2007): **Evolutionary Biology of CD1.** 3–26

De Waal R. M. W., Semeijn J. T., Cornelissen I. M. H. és Ramaekers F. C. S. (1984): **Epidermal Langerhans cells contain intermediate-sized filaments of the vimentin type: An immunocytologic study.** *Journal of Investigative Dermatology.* 82, 6.: 602–604.

Dolfi A., Giannessi F., Bianchi F. és Lupetti M. (1988): **Distribution of esterase activity at the level of the epithelium of the diffusely infiltrated area (DIA) and of the cloaca in the Gallus domesticus: An ultrastructural study.** *The Anatomical Record.* 221, 1.: 469–474.

Echelard Y., Epstein D. J., St-Jacques B., Shen L., Mohler J., McMahon J. A. és McMahon A. P. (1993): **Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity.** *Cell.* 75, 7.: 1417–1430.

Fan Chen M., és Tessier-Lavigne M. (1994): **Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: Evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog.** *Cell.* 79, 7.: 1175–1186.

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.

Fellah J. S., Jaffredo T., Nagy N. és Dunon D. (2013): **Development of the Avian Immune System.** *Avian Immunology: Second Edition.* 45–63.

Funk P. E., és Palmer J. L. (2003): **Dynamic control of B lymphocyte development in the bursa of Fabricius.** *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis .* 51. 389–398

Funk P. E., Tregaskes C. A., Young J. R. és Thompson C. B. (1997): **The Avian chB6 (Bu-1) Alloantigen Can Mediate Rapid Cell Death.** *Journal of Immunology.* 159, 4.: 1695–1702.

Garcia K. C. (2019): **Dual Arms of Adaptive Immunity: Division of Labor and Collaboration between B and T Cells.** *Cell.* 179, 1: 3–7.

Glick B. (1956): **Normal Growth of the Bursa of Fabricius in Chickens.** *Poultry Science.* 35, 4: 843–851.

Houssaint E., Belo M. és Le Douarin N. M. (1976): **Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras.** *Developmental Biology.* 53, 2: 250–264.

Houssaint E. (1987): **Cell lineage segregation during bursa of Fabricius ontogeny .** *Journal of Immunology* 138(11):3626-34

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.

Igyártó B. Z., Nagy N., Magyar A. és Oláh I. (2008): **Identification of the avian B-cell-specific Bu-1 alloantigen by a novel monoclonal antibody.** *Poultry Science.* 87, 2: 351–355.

Kaiser P., és Balic A. (2015): **The Avian Immune System. Sturkie's Avian Physiology: Sixth Edition. Sixth Edit. .** *Elsevier.* 403-418

Krauss S., Concordet J. P. és Ingham P. W. (1993): **A functionally conserved homolog of the Drosophila segment polarity gene hh is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos.** *Cell.* 75, 7: 1431–1444.

Lampisuo M., Arstila T. P., Liippo J. és Lassila O. (1998): **Expression of chL12 surface antigen is associated with cell survival in the avian bursa of Fabricius.** *Scandinavian Journal of Immunology.* 47, 3: 223–228.

Lee S. H., Lillehoj H. S., Park M. S., Baldwin C., Tompkins D., Wagner B., Del Cacho E., Babu U. és Min W. (2011): **Development and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive with chicken CD80.** *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 34, 3: 273–279.

Lerner K. G., Glick B. és McDuffie F. C. (1971): **Role of the bursa of Fabricius in IgG and IgM production in the chicken: evidence for the role of a non-bursal site in the development of humoral immunity..** *The Journal of Immunology.* 107, 2: 493–503.

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., Chrzaogonekstek 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.

Mast J., Goddeeris B. M., Peeters K., Vandesande F. és Berghman L. R. (1998): **Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01.** *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 61, 2–4: 343–357.

Masteller E. L., Larsen R. D., Carlson L. M., Pickel J. M., Nickoloff B., Lowe J., Thompson C. B. és Lee K. P. (1995): **Chicken B cells undergo discrete developmental changes in surface carbohydrate structure that appear to play a role in directing lymphocyte migration during embryogenesis.** *Development.* 121, 6: 1657–1667.

Moore M. A. S., és Owen J. J. T. (1965): **Chromosome marker studies on the development of the haemopoietic system in the chick embryo.** *Nature.* 200. 9–11

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., Barad C., Graham H. K., Hotta R., Cheng L. S., Fejszak N. és Goldstein A. M. (2016): **Sonic hedgehog controls enteric nervous system development by patterning the extracellular matrix.** *Development (Cambridge)*. 143, 2.: 264–275.

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., Magyar A., Dávid Cs., Gumati M. K. és Oláh I. (2001): **Development of the follicle-associated epithelium and the secretory dendritic cell in the bursa of Fabricius of the guinea fowl (*Numida Meleagris*) studied by novel monoclonal antibodies.** *Anatomical Record*. 262, 3.: 279–292.

Nagy N., Magyar A., Tóth M. és Oláh I. (2004): **Quail as the Chimeric Counterpart of the Chicken: Morphology and Ontogeny of the Bursa of Fabricius.** *Journal of Morphology*. 259, 3.: 328–339.

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.

Oláh 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 testosterone-treated chick embryos.** *Poultry science*. 65, 3.: 574–588.

Oláh I., Gumati K. H., Nagy N., Magyar A., Kaspers B. és Lillehoj H. (2002): **Diverse expression of the K-1 antigen by cortico-medullary and reticular epithelial cells of the bursa of Fabricius in chicken and guinea fowl.** *Developmental and Comparative Immunology*. 26, 5.: 481–488.

Oláh 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.** Karel A. S., Bernd K., Pete K., *Avian Immunology: Second Edition*. Academic Press 11-44 .

Palojoki E., Toivanen P. és Jalkanen S. (1993): **Chicken B cells adhere to the CS-1 site of fibronectin throughout their bursal and postbursal development.** *European Journal of Immunology*. 23, 3.: 721–726.

Paramithiotis E., és Michael J. H. R. (1994): **B cell emigration directly from the cortex of lymphoid follicles in the bursa of Fabricius.** *European Journal of Immunology*. 24, 2.: 458–463.

Paramithiotis E., és Ratcliffe M. J. H. (1994): **Survivors of Bursal B Cell Production and Emigration.** *Poultry Science*. 73(7): 991–997

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.

Pinheiro A., Lanning D., Alves P. C., Mage R. G., Knight K. L., Van Der Loo W. és Esteves P. J. (2011): **Molecular bases of genetic diversity and evolution of the immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV) gene locus in leporids.** *Immunogenetics*. 63, 7.: 397–408.

Pink J. R., Vainio O. és Rünbeek A. M. M. (1985): **Clones of B lymphocytes in individual follicles of the bursa of Fabricius.** *European Journal of Immunology.* 15, 1.: 83–87.

Ratcliffe M. J. H. (2006): **Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development.** *Developmental and Comparative Immunology.* 30, 1–2.: 101–118.

Ratcliffe M. J. H., Lassila O., Pink J. R. L. és Vainio O. (1986): **Avian B cell precursors: Surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event.** *European Journal of Immunology.* 16, 2.: 129–133.

Reynaud C. A., Imhof B. A., Anquez V. és Weill J. C. (1992): **Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo.** *EMBO Journal.* 11, 12.: 4349–4358.

Reynaud C. A., Anquez V., Dahan A. és Weill J. C. (1985): **A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity.** *Cell.* 40, 2.: 283–291.

Reynaud C. A., Anquez V., Grimal H. és Weill J. C. (1987): **A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire.** *Cell.* 48, 3.: 379–388.

Reynaud C. A., Dahan A., Anquez V. és Weill J. C. (1989): **Somatic hyperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region.** *Cell.* 59, 1.: 171–183.

Reynolds J. D., és Morris B. (1984): **The effect of antigen on the development of Peyer's patches in sheep.** *European Journal of Immunology.* 14, 1.: 1–6.

Ribatti D. (2010): **Protagonists of medicine.** *Protagonists of Medicine.* 1–149.

Staines K., Young J. R. és Butter C. (2013): **Expression of Chicken DEC205 Reflects the Unique Structure and Function of the Avian Immune System.** *PLoS ONE.* 8, 1.: 1–6.

Ting-Berretth S. A., és Chuong C. M. (1996): **Sonic hedgehog in feather morphogenesis: Induction of mesenchymal condensation and association with cell death.** *Developmental Dynamics.* 207, 2.: 157–170.

Toivanen P., és Toivanen A. (1973): **Bursal and postbursal stem cells in chicken. functional characteristics.** *European Journal of Immunology.* 3, 9.: 585–595.

Vainio O., Dunon D., Aïssi F., Dangy J. P., McNagny K. M. és Imhof B. A. (1996): **HEMCAM, an adhesion molecule expressed by c-kit+ hemopoietic progenitors.** *Journal of Cell Biology.* 135, 6.: 1655–1668.

Varki A. (1994): **Review Selectin ligands.** *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences.* 91: 7390–7397

Weill J. C., Reynaud C. A., Lassila O. és Pink J. R. L. (1986): **Rearrangement of chicken immunoglobulin genes is not an ongoing process in the embryonic bursa of Fabricius.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 83, 10.: 3336–3340.

Yvernogeu L., Gautier R., Petit L., Khoury H., Relaix F., Ribes V., Sang H., Charbord P., Souyri M., Robin C. és Jaffredo T. (2019): **In vivo generation of haematopoietic stem/progenitor cells from bone marrow-derived haemogenic endothelium.** *Nature Cell Biology.* Köt. 21. Springer US.

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszöntettel tartozom témavezetőmnek Dr. Nagy Nándornak a Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Óssejt és Kísérletes Embriológia laboratórium vezetőjének segítségéért, hasznos tanácsaiért és rendkívüli odafigyeléséért melyekre mindvégig számíthattam.

Köszönettel tartozom belső konzulesemnek Dr. Erdei Annának az Eötvös Lóránd Tudományegyetem egyetemi tanárának, aki hasznos tanácsokkal látott el és segített a szakdolgozat megírásában.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Oláh Imrének, a Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet egyetemi tanárának, aki munkámat sok értékes tanáccsal segítette.

Továbbá köszönöm az Óssejt és Kísérletes Embriológia Laboratórium munkatársainak akik elméleti és gyakorlati tudásukkal, valamint barátságukkal végig támogattak: Dr. Dóra Dávid, Kovács Tamás, Orbán Lili, Halasy Viktória. Illetve külön köszönöm Szócs Emókének a közös munkát, akinek segítése az egész kísérletsorozat idején nagyon értékesnek bizonyult, illetve Jancsovics Dalmának aki többször átolvasta kitartóan a szakdolgozatot elütések keresése végett.