

# A bursa Fabriciiben zajló limfoid follikulogenezis karakterizálása

Diplomamunka  
Biológus mesterszak  
Molekuláris, Immun- és Mikrobiológia specializáció

készítette:  
**SZŐCS EMŐKE**

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

# Tartalomjegyzék

<b>Tartalomjegyzék</b> .....	<b>2</b>
<b>Bevezetés</b> .....	<b>3</b>
<b>Irodalmi áttekintés</b> .....	<b>4</b>
1. A bursa Fabricii felfedezése, immunológiai jelentősége .....	4
2. A bursa Fabricii szöveti szerkezete, jellegzetes sejtípusai.....	5
3. A bursa Fabricii embrionális fejlődése .....	7
4. „Lymphoid tissue inducer” sejtek jelentősége .....	12
<b>Célkitűzések</b> .....	<b>14</b>
<b>Anyagok és módszerek</b> .....	<b>15</b>
1. Kísérleti állatok.....	15
2. Minták szövettani feldolgozása.....	15
3. Zselatinos fagyasztott metszetek készítése .....	15
4. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia.....	15
4.1. <i>Immunhisztokémia</i> .....	16
4.2. <i>Kettős immunfluoreszcens festés</i> .....	16
5. Félvékony immunhisztokémia .....	18
6. Felhasznált oldatok .....	19
7. Sejtosztódás vizsgálata EdU jelöléssel .....	20
8. Chorioallantois membrán transzplantáció.....	20
9. Metszetek kiértékelése .....	21
<b>Eredmények és megvitatásuk</b> .....	<b>22</b>
1. A bursa Fabricii embrionális megjelenése és hematopoetikus sejtek általi kolonizációja.....	22
2. A bursa epitélium kolonizációja .....	24
3. A folliculusbimbók nyúlványos morfológiájú sejtek általi kolonizációja .....	26
4. A folliculusbimbók B-sejtes kolonizációja .....	28
5. A bursa Fabriciit kolonizáló sejtípusok differenciálódásának követése csirke-kacsa kiméra technikával .....	30
<b>Következtetések</b> .....	<b>35</b>
<b>Összefoglaló</b> .....	<b>38</b>
<b>Summary</b> .....	<b>39</b>
<b>Hivatkozások</b> .....	<b>40</b>
<b>Köszönetnyilvánítás</b> .....	<b>43</b>

## Bevezetés

Az immunrendszer, mint specializált szervek, sejtek, szolubilis faktorok komplex hálózata biztosítja a szervezet immunhomeosztázisának megőrzését és a különböző kórokozók elleni hatékony védekezés kialakulását. Az elmúlt évtizedek immunológiai kutatásai hatalmas ismeretanyagot jelentenek az immunrendszer komponenseiről, ezek kialakulásáról és egymással való interakciójukról. A madarak immunrendszere alapvető immunológiai kérdések megválaszolását tette lehetővé, értékes modellszervezatként szolgál az immunológiai kérdések megválaszolására, valamint olyan gyakorlati haszonnal bíró folyamatok kivitelezését eredményezi, mint a vakcinatermelés. Az embriók egyszerű fenntartása laboratóriumi keltetőgépekben, könnyű hozzáférhetőségük, valamint a különböző embriómanipulációs technikák megvalósításának könnyedsége miatt a csirke széles körben elterjedt és ideális modellszervezetté vált az immunológia és fejlődésbiológia számára.

Az adaptív immunrendszer humorális ágának központi elemeit, a B-sejteket, elsőként a madarak sajátos primer nyirokszervében a bursa Fabriciiben fedezték fel. A B-sejtek funkciója ma már alapvető dogmaként van számon tartva az immunológiában, az antigénspecifikus ellenanyag repertoár létrehozásának képessége központi szerepet tölt be a funkcionális immunrendszer kialakításában. A B-sejtek funkcióját és kölcsönhatását más immunsejtekkel részletesen ismerjük, azonban azok a molekuláris események, szöveti környezetből származó szolubilis faktorok és celluláris hatások, amelyek a B-sejtek ontogenezisét irányítják csak részben ismertek. A B-sejt progenitorok *in vitro* sejt kultúrákban történő fenntartása, differenciáltatása mai napig körülményes és számos nehézséget állít a kutatók elé. A különböző B-sejteket helyreállító őssejt terápiák nagy mértékben igénylik, mind a módszertani fejlesztéseket, mind pedig a B-sejt fejlődéssel kapcsolatos alapos tudást.

A bursa Fabricii speciális mikrokörnyezete a B-sejt fejlődést célzó vizsgálatok számára értékes információkkal szolgálhat, hiszen ebben a sajátos szöveti környezetben a B-sejtek kizárólagos fejlődése zajlik, izoláltan más limfoid, mieloid és eritroid vonalak fejlődésétől. Kísérletes munkám célja a bursa Fabricii embrionális fejlődésének részletes megismerése, azon sejt típusok és mikrokörnyezeti faktorok azonosítása, amelyek kiemelten fontosak az embrionális fejlődés során kialakuló limfoid folliculusok létrehozásában.

# Irodalmi áttekintés

## 1. A bursa Fabricii felfedezése, immunológiai jelentősége

A bursa Fabricii első irodalmi említése Hieronymus Fabricius ab Aquapendente nevéhez fűződik, aki 1621-ben a „De Formatione Ovi et Pulli” munkájában számol be egy madarakra jellemző, a kloáka proctodeális régiójához asszociált zsákszerű szervről. Az utóbbi évszázadban számos elmélet fogalmazódott meg a szerv funkciójával kapcsolatban, több esetben hivatkoztak rá, mint a spermiumok tárolásáért felelős szerv, illetve egy a növekedést és szexuális érettséget befolyásoló endokrin vagy limfoid szerv (Glick, 1994; Ribatti és mtsai., 2020). Valódi szerepére azonban csak 350 év múlva, egy véletlen felfedezésnek köszönhetően derült fény, amikor az 1950-es években Bruce Glick állatorvos által bursectomizált madarak kerültek felhasználásra egy immunológiai gyakorlaton *Salmonella spp.* O antigén elleni antitest termeltetésre. A rutin kísérlet meglepő eredményekkel szolgált, a bursectomizált madarak egyike sem volt képes antigén specifikus ellenanyag termelésre. További kísérletek elvégzése során arra a következtetésre jutottak, hogy a bursának kulcsfontosságú szerepe van az antigénspecifikus ellenanyag termelésben és ezáltal a megfelelő immunválasz kialakulásában (Cooper és Petersont, 1965; Cooper, 2015; Glick és mtsai., 1956). Ebből kiindulva a bursa Fabricii az immunológiai kutatás fókuszába került, és kiegészülve a tímusszal folytatott kísérletek eredményeivel kialakult a modern immunológia egyik alappillére, az immunitás disszociációs elmélete, mely először a csirke immunrendszerével kapcsolatosan fogalmazódott meg. A bursa B-limfocitái az ellenanyag által közvetített immunválasz komponensei, míg a tímusz T-limfocitái a sejt-közvetített immunválasz kivitelezői, és a két rendszer egymásra épülve biztosítja az egyed immunhomeosztázisának fenntartását (Cooper és mtsai., 1965; Warner és mtsai., 1965). Az adaptív immunrendszer B- és T-dependens komponenseinek elkülönítése a mai napig tükrözi ennek a felfedezésnek a jelentőségét. Későbbiekben az emlősök esetében is azonosítottak úgynevezett bursa-ekvivalens nyirokszerveket, amelyek speciális mikrokönyezete lehetővé teszi a B-sejtek fejlődését és proliferációját. Ide sorolják az ileális Peyer-plakkokat (Reynaud és mtsai., 1991), nyúlban az appendixet (Pospisil és Mage, 2011), míg az emberben és más emlősökben a csontvelőt (Abdou és Abdou, 1972).

Egy immunkompetens egyed számára elengedhetetlen a változatos ellenanyag repertoár kialakítása, a környezetből érkező antigének nagy számának hatékony felismerése és ezáltal a szervezet védelmének biztosítása. Emlősök esetén ez a folyamat az immunglobulin (Ig) gének szomatikus génátrendeződése eredményeként valósul meg. Az Ig könnyű lánc esetében számos variábilis és összekötő (joining) régió közül random módon egymás mellé kerülő szegmensek

alakítják a végső szekvenciát, míg a nehéz lánc esetében a V és J régiók mellé még egy diverzitásért felelős D-régió is beépülésre kerül. Mivel a csíravonal DNS számos V, D és J régiót tartalmaz, ezek véletlenszerű kombinációja, az így kialakult könnyű és nehéz láncok különböző páronkénti kapcsolódása, valamint a génátrendeződési folyamat során beépülő és kivágódó nukleotidok lehetővé teszik az antigénfelismerő receptorok  $10^{11}$  nagyságrendű repertoárjának kialakulását. Emlősök esetében ez a folyamat az egyed egész élete során megvalósulhat (Tonegawa, 1983). Ezzel szemben a madarak csak egy, vagy nagyon kevés V, D és J régióval rendelkeznek, és így szomatikus génátrendeződéssel nem jöhet létre olyan méretű ellenanyag-készlet, amelyre az egyednek szüksége lenne. A folyamatért ebben az esetben a szomatikus génkonverzió felelős. A nehéz és a könnyű lánc Ig lokuszai ún. pszeudogéneket tartalmaznak, amelyek a génkonverzió során a variábilis régió gészegmenseibe épülnek be. A pszeudogénekben megfigyelhető nagy variabilitás, és akár több génkonverziós esemény létrejötte egyetlen V régió esetében képes biztosítani a megfelelő ellenanyag-repertoár kialakulását (Reynaud és mtsai., 1994). Jellegzetes, hogy a szomatikus génkonverzió kizárólag a bursa Fabricii-ben zajlik. Ezt bizonyítják azok a kísérletek, amelyek során a fejlődés korai stádiumában bursectomizált madarak csak kevés számú és nem specifikus IgM ellenanyag termelésére képesek, és izotípusváltás sem valósul meg esetükben (Davison, 2014). Az embrionális fejlődés során bursába érkező B-sejt prekurzorok már áttestek a szomatikus génátrendeződésen, az embrionális lépben IgM-et fejeznek ki (Arakawa és Buerstedde, 2004). A bursába érkező B-sejt prekurzorok intenzíven osztódnak, a speciális bursai mikrokozonyezetben képesek a szomatikus gének konverzióra és ezáltal az ellenanyag repertoár kialakítására. Ez a folyamat az embrionális fejlődés késői szakasza során zajlik, a 15. és 18. inkubációs napok között, illetve kis mértékben folytatódik a kikelést követő 5-7 hétig is (Reynaud és mtsai. 1994). Az ivarérett kor elérésével a tímusszal együtt a bursa degradációja is megkezdődik, a szerv teljes involúciója 5 hónapos korra lezajlik. A bursa jellegzetes mikrokozonyezetének és szöveti szerkezetének eltűnésével a szerv elveszíti a B-sejtek képzésének képességét, a felnőtt egyedek esetében a B-sejtek keletkezése ún. post-bursális őssejtekből a csontvelőben történik (Davison, 2013).

## **2. A bursa Fabricii szöveti szerkezete, jellegzetes sejtípusai**

A bursa Fabricii a madarak gesztenye nagyságú, bélhez asszociált primer nyirokszerve, amely a kloáka proctodeális régiójától dorzálisan foglal helyet (1A. ábra). A szervet kívülről egy kötőszövetes tok és izomréteg határolja, a lument 15-20 hosszanti redő tagolja, melyek tengelyében fut a bursa artériás, vénás és nyirokkeringése. A redők mindegyikében a bursa

szerkezeti és működési alapegységeiként szolgáló limfoid folliculusok foglalnak helyet. A redők felszíni hámjának 90%-át a hengerhám típusú interfollikuláris epitélium (IFE) adja, amely a folliculusok csatlakozásánál egy jellegzetes folliculus-asszociált epitéliummal (FAE) egészül ki (Oláh és mtsai., 2013). A FAE által minden folliculus direkt kapcsolatban áll a bursa lumenével (Nagy és mtsai., 2001), amelyek funkcionálisan a bélhez asszociált nyirokszövetekben megtalálható M-sejtekkel megegyező szerepet tölthetnek be (1B. ábra). A FAE sejtei kétirányú anyagtranszportot tesznek lehetővé a bursa lumene és a folliculusok velőállománya között, amely úton az antigén átjutása is lehetővé válik (Balic és mtsai., 2019).

A folliculusok száma a bursában 20.000-re tehető, melyek mind szerkezetileg, mind működésileg két jól elkülönült kompartmentből, egy központi elhelyezkedésű velőállományból és egy ezt körülvevő kéregállományból állnak. A medulla egy klasszikus limfo-epiteliális szövet képét mutatja, alapállományát ektodermális eredetű hámretikulum adja (Nagy és Olah, 2010), melyet számos B-limfocita, szekréción dendritikus sejt és makrofág tölt fel (1C, E, F. ábra). A velő- és kéregállomány között jellegzetes bazális membrán húzódik. A velőállomány nem vaszkularizált, szemben a kéregállománnyal, amely számos kapillárist tartalmaz a kéreg-velő határ mentén húzódó bazális membrán alatt (Madej és mtsai., 2013). A folliculusok kéregállománya mezodermális eredetű, alapállományát retikuláris sejtek alkotják, amelyek fibronectinben és kollagénekben gazdag extracelluláris mátrixot (ECM) termelnek, és vimentin/desmin kettős pozitívak (Nagy és mtsai., 2004; Nagy és mtsai., 2016, 2001) (1B. ábra). A perifériára kijutott érett B-sejtek a jelenlegi elképzelés szerint a kéreg gyorsan osztódó sejtpopulációjából származtathatók. A B-sejtek emigrációja a bursából a kikelés időpontjával párhuzamosan indul el, és ez a folyamat egészen a bursa involúciójáig megfigyelhető (Davani és mtsai., 2014).

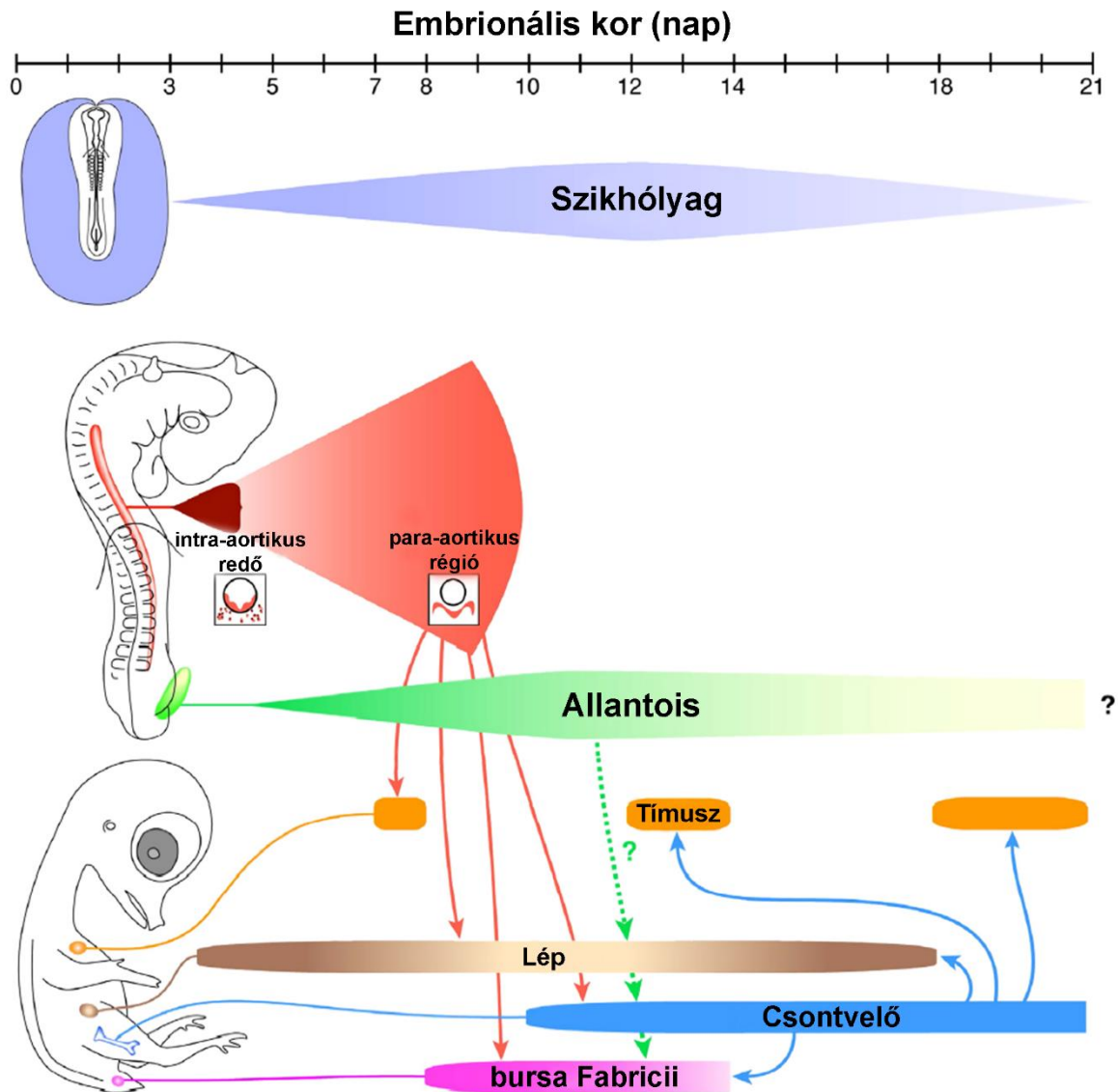
Szemben a velőállománnyal, a kéregállomány szekréción dendritikus sejteket nem vagy csak elszórtan tartalmaz, azonban számos makrofág és B-limfocita található meg benne. A kéregállományban kis számban T-sejtek is detektálhatók (1C-F. ábra), mennyiségük csak a folliculusok sérülése, valamint a B-sejtek patológiás vagy az involúció során zajló fiziológiás számcsökkenése során növekszik meg (Oláh és mtsai., 2013).



kapni, miszerint a bursa epiteliális telepe ektodermális eredetű, amelyet tovább erősít a Sonic hedgehog (Shh) gén jellegzetes expressziója, amely jelen van a teljes utóbél és kloákális endodermában, szemben az ektodermális eredetű proctodeummal és bursával, ahol kifejeződése nem figyelhető meg (Nagy és Oláh, 2010). Az embrionális fejlődés 8-9. napjára az epiteliomezenchymális bursa telepe képessé válik a hematopoetikus eredetű sejtek fogadására, amelyek tovább indukálják a bursa fejlődését, és a B-sejt prekursorok számára megfelelő mikrokörnyezet kialakításában játszanak fontos szerepet.

A bursát vértképző őssejtek kolonizálják. A szikhólyagból származó primitív vértképzés elemei csak az embrionális fejlődés 5. napjáig biztosítják a hematopoetikus sejteket. A később megjelenő aorta-asszociált területekről származó vértképző őssejtek (hematopoetic stem cell, HSC) az egyed egész élete során képesek biztosítani a különböző mieloid, eritroid és limfoid előalakokat, amelyek a megfelelő szöveti környezetben és az erre szakosodott nyirokszervekben érett és funkcionális sejtalakokká fejlődnek (Fellah és mtsai., 2013). A definitív embrionális vértképzés helyszíne a fejlődő aorta és az ezt övező mezenchymális régió, ahol az embrionális fejlődés 3. napjától kezdődően a fejlődő aorta ventrális falának belső felszínén ún. intra-aortikus redők jelenléte figyelhető meg (Olah és mtsai., 1988). A redőket alkotó sejtek vértképzésre jellemző Runx1 génexpressziót mutatnak, és a CD45 közös-leukocita markert expresszálják (Jaffredo és mtsai., 2005). A ventrális endotéliumból leváló hematopoetikus sejtek a keringéssel távoznak, és egy limitált, megújulásra képtelen hematopoetikus sejtpopulációt jelentenek (Yvernogeu és Robin, 2017). A fejlődés 5-6. napján az intra-aortikus redők sejtjeinek egy szubpopulációja a dorzális mezentériumba vándorol, ahol kialakítják a para-aortikus régiót és ezzel az aortában zajló hematopoezis fázisa lezárul. A para-aortikus régióban zajló hematopoezis a fejlődés 6-9. napja között kifejezett, és az itt képződő sejtek képesek a primer nyirokszervek (lép, tímusz, bursa) és kis mértékben a csontvelő kolonizálására (Jaffredo és Yvernogeu, 2014) (3. ábra).



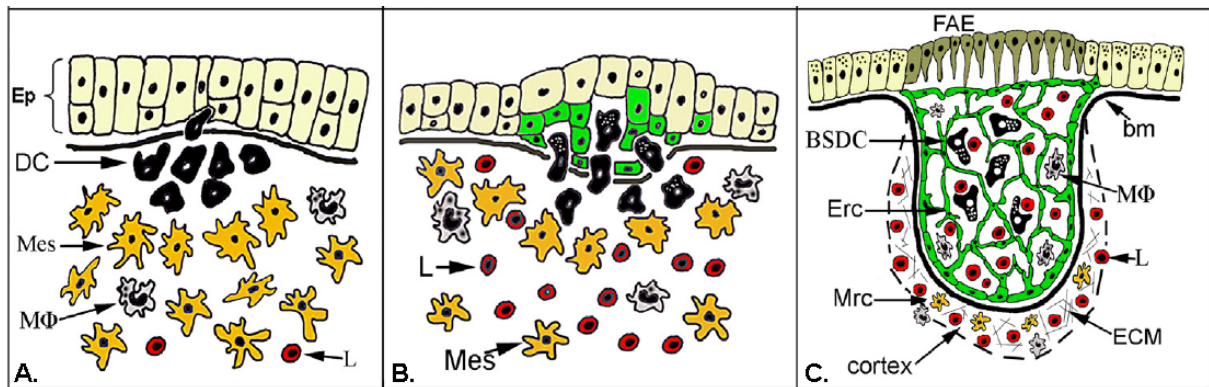


**3. ábra. A madarakban zajló embrionális vérképzés és a nyirokszervek benépesülésének sémás ábrája.** Az embrionális kor függvényében a vérképző sejtek keletkezési helye, illetve a különböző limfo-mieloid célszervek kolonizációs időintervalluma került feltüntetésre. Az embrionális vérképzés fő helyei: szikhólyag, intra-aortikus redő, para-aortikus régió, allantois. A nyirokszervek közül a lép kolonizációja kezdődik meg elsőként, amelyet a tímusz, a bursa Fabricii, majd a csontvelő követ (Fellah és mtsai., 2013 után módosítva).

Az elkötelezett, para-aortikus régióból származó, CD45+ hematopoetikus sejtek egy rövid időablak, a fejlődés 9-15. napja között kolonizálják a bursa embrionális telepét. A fejlődés 10. napjára a bursa hám alatti mezenchymájában számos CD45+ sejt figyelhető meg, melyek között toluidinkékkal való bazofil festődésük alapján sötét sejteket különíthetünk el. A sötét sejtek nyúlványos morfológiával rendelkeznek, CD45/MHCII kettős pozitivitást mutatnak és a felszíni hám közelében csoportosulnak (Nagy és mtsai., 2004). A sötét sejtek bevándorlásával egyidőben a mezenchymában megnő a plazminogén-aktivátor és az alkalikus foszfatáz enzimek

jelenléte, melyek képesek a mezenchymális mikrokörnyezet megváltoztatására, és lehetővé teszik a CD45/MHCII pozitív sejtek hámba vándorlását (Fellah és mtsai., 2013; Valinsky és mtsai., 1981). A fejlődés 11. napjára a „sötét sejtek” átlépik a bazális membránt és belépnek a felszíni hámba (4. ábra). Ebben a stádiumban, a CD45 és MHCII expresszió mellett, a sejtekben vimentin intermedier filamentumok és 74.3 monoklonális antitesttel kimutatható dendritikus sejt specifikus granulumok mutathatók ki. Ezen CD45/MHCII/vimentin/74.3 pozitív sejtek dendritikus sejt prekurzoroknak tekinthetők, amelyek a hámmal kialakított dendro-epiteliális kölcsönhatás eredményeként indukálják a bursai limfoid folliculusok fejlődését (Nagy és mtsai., 2004). A felszíni hám intenzíven osztódni kezd, és maga előtt tolvaa a bazális membránt kialakítja a folliculusbimbókat, amelyek a kifejlett folliculusok velőállomány kezdeményének tekinthetők (Nagy és mtsai., 2001). Az első kolonizációs hullámban érkező CD45+ sejtek egy része nem éri el a felszíni hámot és a bursai mikrokörnyezetben KUL01/74.2+ makrofággá differenciálódnak vagy részt vesznek a bursában zajló embrionális granulopoezisben, ahol Grl-1/Grl-2 + granulocitákká válnak (Fellah és mtsai., 2013).

A bursa kolonizációjának második hulláma a B-sejt prekurzorok megjelenésével folytatódik, amelyek a fejlődés 10-15 napja között jelennek meg a bursa mezenchymában (Nagy és mtsai., 2004). A bursába érkező B-sejt prekurzorok chB6 pozitívak, valamint CD45, CD1 és sCD15 (szialil LewisX) szénhidrát epitópokat fejeznek ki. Ez utóbbi a B-sejt prekurzorok szelektin-mediált migrációját biztosítja a keringésen keresztül (Masteller és mtsai., 1995; Houssaint és mtsai., 1987; Nagy és mtsai., 2004). A para-aortikus régióból és a lépből származó B-sejt prekurzorok átestek az Ig-gének szomatikus átrendeződésén, így funkcionális B-sejt receptorral rendelkeznek, IgM-et expresszálnak. Ezek a chB6/IgM+ sejtek azok, amelyek képesek a dendro-epiteliális folliculusbimbók kolonizálására. 2-3 B-sejt prekurzor folliculusbimbókba történő migrációja által kialakul az a limfo-epiteliális szövet, amely a speciális mikrokörnyezetet biztosítja a B-sejtek fejlődése számára (Pink és mtsai., 1985). A folliculusbimbókba vándorolt B-sejt prekurzorok intenzív osztódásba kezdenek, és kialakítják a fejlődő folliculusok B-sejt állományát. Azon sejtek amelyek nem képesek funkcionális B-sejt receptor létrehozására, apoptózissal eltávolításra kerülnek.



**4. ábra. A bursa Fabricii limfoid folliculusainak embrionális fejlődése.** (A) Hematopoetikus eredetű „sötét sejtek” (dendritikus sejt prekurzor, DC) megjelenése a hám alatti mezenchymában; folliculusbimbók megjelenése a „sötét sejtek” hámba vándorlásával és proliferációjával. (B) Dendro-epiteliális szövet kialakulása; folliculuskezdemények B-limfocita prekurzorok (L) általi kolonizációja és a B-sejtek proliferációja. (C) A folliculus asszociált epitélium (FAE) kialakulása; B-sejtek migrációja a bazális membránon (bm) kívülre és a kéregállomány kialakulása. BSDC: szekréción dendritikus sejt, ECM: extracelluláris mátrix, Ep: epitélium, Erc: hámretikulum sejt, Mes: mezenchyma, MΦ: makrofág, Mrc: mezenchymális retikuláris sejt (Fellah és mtsai, 2014)

Ebben a speciális bursai mikrokoznyezetben kezdődik el a fejlődés 15-17. napja között a szomatikus génkonverzió folyamata, amely a bursa involúciójáig tart és felelős a diverz immunglobulin repertoár kialakításáért. A szomatikus génkonverzió áttesett chB6 pozitív sejtek a szialil LewisX antigén expressziót LewisX antigén expresszióra cserélik (Masteller és mtsai, 1995). Mivel a bursai mikrokoznyezet elengedhetetlen a génkonverzió folyamatok lezajlásához, ennek regulációja feltehetően a folliculusok stormális mikrokoznyezetének befolyása alatt áll. A pontos folyamatok ismeretlenek, azonban a bursai szekréción dendritikus sejtek által termelt molekulák kulcsfontosságú szerepet játszhatnak a folyamatban (Nagy és mtsai., 2016; Oláh és Nagy, 2013).

A génkonverzió folyamatok lezajlásával, a kikeléssel egyidőben megkezdődik a bursai B-sejtek kivándorlása a perifériás nyirokszervekbe. Hasonlóan a B-sejtek csontvelőből történő emigrációjához és a germinális centrumokban zajló sejt vándorláshoz, az érett bursai B-sejtek is a CXCR4 kemokin receptor kifejezésének csökkentésével képesek elhagyni a bursát a kéregállomány kapilláris hálózata mentén (Nagy és mtsai., 2020). Ellentétben az emlősökkel, a madarakban nyirokcsomók nem fejlődnek, helyette kiterjedt mukóza-asszociált nyirokszövet figyelhető meg, amely a bélrendszer esetében különösen kifejezett. A madarakban ez magába foglalja az nyelőcső és a gyomor határán található eosophagalis tonzillákat, a pylorus tonzillákat, a duodenum és jejunum határán található Meckel divertikulumot, az ileális Peyer-plakkokat, illetve az ileocecalis kapcsolatnál található coecalis tonzillákat (Nagy és Oláh,

2007; Oláh és mtsai., 1984, 2003). A coecalis tonsillák a madarak páros coecumjának proximális részén fejlődő másodlagos nyirokszervek, amelyek kikelést követő állapotban számos csíracentrumot tartalmaznak. Nagy számú chB6+/IgM+ B-sejt van jelen a folliculusokban, az interfollikuláris régiót főként CD4+ T-sejtek alkotják (Oláh és mtsai., 2013). Az anális nyíláson bejutott antigének, hasonlóan a bursa Fabriciihez, a coecalis tonsillákban is detektálhatók, részt véve ezáltal az antigének bemutatásában. A többi bélhez-asszociált szekunder nyirokszervhez hasonlóan a coecalis tonsilla is a kikelést követő állapotban fejlődik a legintenzívebben. A coecalis tonsillák embrionális fejlődését és pontos funkcióját számos kérdés övezi. Egyes elképzelések szerint a coecalis tonsilla szerepet játszik a coecumba jutó antigének neutralizálásában, ugyanakkor a bursa fejlődésében jelentkező zavarok esetén képes lehet bizonyos fokig pótolni ennek szerepét.

#### **4. „Lymphoid tissue inducer” sejtek jelentősége**

Az immunrendszer evolúciójában nagy újtásként szerepel a primer nyirokszervek mellett, olyan specializált régiók megjelenése a szervezetben, ahol az immunsejtek aktivációja hatékonyan megtörténhet. A másodlagos nyirokszervek kulcsszerepet játszanak a megfelelő immunválasz kiváltásában, a szervezet olyan stratégiailag fontos pontjain helyezkednek el, ahol az immunrendszer adaptív ágát hatékonyan aktiválni képesek. Ezen másodlagos nyirokszervek emlősök és ember esetében a lép, a perifériás és mezenterialis nyirokcsomók és a jellegzetes mukóza asszociált nyirokszövet, amely a gasztrointesztinális traktus esetében számos kulcsfontosságú struktúrát foglal magába, mint az appendix és az ileális Peyer-plakkok. Annak ellenére, hogy ezek a struktúrák szerkezetileg számos hasonlóságot mutatnak, jól elkülönült B- és T-sejtes régiók jelenlétével, a fejlődésüket különböző molekuláris folyamatok irányítják (Silva-Sanchez és Randall, 2019).

Ellentétben a madarakkal az emlősök bélhez asszociált nyirokszerveivel végzett kísérletek szerint az embrionális fejlődést egy részletesen jellemzett folyamat vezérli, amely az intrauterin élet során, exogén antigén inger nélkül elindul és egy jellegzetes sejtpopuláció jelenlétét igényli. A nyirokszervek fejlődését elindító sejteket először a 90-es évek végén azonosították újszülött egerek perifériás nyirokcsomóinak vizsgálata során, mint egy CD45+/CD3-/CD4+ hematopoetikus sejtpopuláció. További vizsgálatok kimutatták, hogy ezek a limfoid sejtek IL7R $\alpha$  citokin-receptort hordoznak, jellemző a ROR $\gamma$ t transzkripciós faktor expressziója, de nincs T-sejtképző potenciáljuk, valamint immunglobulint sem termelnek. *In vitro* tenyésztésben az NK-sejtekre jellemző NK1.1 marker kifejeződését lehet rajtuk kiváltani

(Mebius és mtsai, 1997). Besorolásuk a veleszületett limfoid sejtek (innate lymphoid cells, ILC) kategóriájába történt. Ezek olyan limfociták, amelyek szemben más adaptív immunsejtekkel nem hordoznak antigénfelismerő receptorokat, nem esnek át szomatikus géntrendeződésen és képesek a limfoid szövetek kolonizálására az embrionális fejlődés során (Varadé és mtsai., 2020). A CD3-/CD4+ sejtek kísérletes transzplantációja jelentősen megnövelte a képződő Peyer-plakkok számát (Finke és mtsai, 2002) és ezen hatásuk miatt ezeket a sejteket limfoid szövet indukáló sejtneként (lymphoid tissue inducer cells, LTi) nevezték el (Yoshida és mtsai, 1999; Eberl és Littman, 2003).

Az LTi sejtpopuláció a fejlődő Peyer-plakkok esetében elengedhetetlen szerepet tölt be. A Peyer-plakkok ontogenezise során a CD45+ hematopoetikus eredetű limfoid szövet indukáló sejtek és a mezenchymális eredetű limfoid szövet organizáló (lymphoid tissue organizer, LTo) sejtek közötti interakció kerül előtérbe. Az embrionális fejlődés 12.5 napján a fejlődő középbél anti-mezentériális oldalán VCAM+ mezenchyma sejtek jelennek meg, amelyek a RET tirozin-kináz receptor ligandokat szekretálnak (Hoorweg és Cupedo, 2008). Mivel ezen sejtek aktivitása irányítja a továbbiakban a nyirokszerv kialakulását a szakirodalom limfoid szövet organizátor sejtekként hivatkozik rájuk. Ezen sejtek az embrionális fejlődés 12.5 napján RET ligandok termelésén keresztül egy RET receptorral rendelkező CD45+/CD4+/CD3-/CD11c+/lymphotoxin+ sejtpopuláció megjelenését idézi elő, amelyek az LTo sejtek köré csoportosulnak és aktiválják őket. Az aktiválódó LTo sejtek CXCL13 kemokint szekretálnak, melynek eredményeként a CXCR5 receptort hordozó LTi sejtek nagy tömege jelenik meg a fejlődő másodlagos nyirokszövet kezdeményben. A limfotoxin  $\alpha_1\beta_1$  (LT $\alpha\beta$ ) expresszáló LTi sejtek és a limfotoxin  $\beta$  (LT $\beta$ R) receptort hordozó LTo sejtek közötti interakció fenntartja és tovább erősíti az LTo sejtek CXCL13 ligand termelését (Silva-Sanchez és mtsai., 2019). Ezen kezdeti folyamatok során kialakul a Peyer-plakk kezdemény, amelyet a fejlődő stromális környezet jellegzetes citokin (IL-7, VEGF-C, RANK ligand), kemokin (CXCL12, CXCL13, CCL19, CCL21) és adhéziós molekula (VCAM-1, ICAM-1, MadCAM1) expressziója követ. Ezek a molekulák vesznek részt a továbbiakban a leukociták és limfociták bevonzásában, túlélési szignálokkal látják el az ide érkező sejteket, valamint meghatározzák a sejtek jellegzetes térbeli eloszlását a fejlődő nyirokszövetben, kialakítva a T- és B sejt zónákat (Bar-Ephraim és Mebius, 2016). Madarak nyirokszervének fejlődését célzó vizsgálatok az emlősökben leírt limfoid szövet indukáló és organizáló sejtekhez hasonló struktúrákat nem említene. Korábbi adatok alapján feltételezzük, hogy a bursa Fabricii ontogenezise során a B-sejt prekursorok benépesülését más, vérből származó sejtek bevándorlása előzi meg.

## Célkitűzések

Szakdolgozati munkám során a bursa Fabricii funkcionális alegységeinek tekintett limfoid folliculusok ontogenezisének részletes karakterizálását végeztük el.

Célkitűzéseink a következők voltak:

- A bursa Fabricii epiteliális telepét kolonizáló hematopoetikus sejttípusok azonosítása és jellemzése.
- A limfoid folliculusokat kolonizáló, B-sejt prekursorokat megelőző mieloid és stromális sejtek ontogenezisének leírása, immuncitokémiai és hisztológiai karakterizálása.
- A folliculusok ontogenezisében szerepet játszó limfomieloid őssejtek fejlődési sorstérképezése embriómanipulációs technikák használatával.

# **Anyagok és módszerek**

## **1. Kísérleti állatok**

Immuncitokémiai vizsgálatokra 9-16 napos csirke (*Gallus gallus*, White Leghorn SPF, Phylaxia-Sanophi, Magyarország) embriókat, a chorioallantois-membrán kimérák (CAM) létrehozására 11 napos kacsza (Fehér magyar kacsza, NBGK - Haszonállat-génmegőrzési Intézet, Gödöllő, Magyarország) embriókat használtunk. A tojások inkubálása 37°C-on, 70%-os páratartalom mellett történt a laboratórium keltetőgépeiben (Heka-18 Bruterate, TS-7000C).

## **2. Minták szövettani feldolgozása**

A vizsgálni kívánt szerveket sztereomikroszkóp alatt távolítottuk el mikropreparációra alkalmas eszközökkel (mikrocsipesz, perforált Moria típusú kanál, iridectómiás olló); (Fine Science Tools, USA). A kipreparált szervek fixálását 1 órán keresztül 4%-os paraformaldehid (PFA, Reanal Labor, 25550-0-13-38) oldatban végeztük, majd foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) 3x5 percig mostuk. Ezt követően a szerveket 15%-os szacharózban (Reanal Labor, 07140-0-08-38) inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on, a szacharózt 10%-os zselatinra cseréltük és tovább folytattuk az inkubációt 2 órán keresztül, 37°C-on. Az így impregnált szerveket műanyag tálkába kiöntött, 10%-os zselatin ágyra helyeztük, megfelelő módon orientáltuk, hagytuk, hogy a szervek oda tapadjanak, majd a tálkát teljesen feltöltöttük meleg zselatinnal. A zselatin teljes megszilárdulása után bejelöltük a metszés irányát és ollóval megfelelő méretű blokkot vágunk ki, melyet feliratozott karton darabra helyeztünk és folyékony nitrogénben -60°C-ra hűtött izopentánban (2-methylbutane, Sigma-Aldrich, M-32631) fagyasztottunk 1 percen át. Az így elkészült blokkot felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

## **3. Zselatinos fagyasztott metszetek készítése**

A szövettani metszetek elkészítéséhez Shandon gyártmányú kriótómot használtunk. A fagyasztott blokkok metszése -28°C-on történt és a mintákból 12 µm vastagságú metszeteket vettünk fel poli-L-lysine-nel (Sigma-Aldrich, P8920) bevont tárgylemezre. A metszeteket felhasználásig -20°C-on tároltuk.

## **4. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia**

Az elkészült fagyasztott zselatinos metszetek alkalmasak immunhisztokémiai és immuncitokémiai vizsgálatok elvégzésére, lehetőséget nyitva ezáltal specifikus molekulák és sejttípusok azonosítására, különböző szervek sejtszintű szerkezetének azonosítására.

#### *4.1. Immunhisztokémia*

A fagyasztott zselatinos metszeteket előre melegített PBS-ben, 10 percig rehidráltuk, ami elegendő időt biztosít a zselatin kioldódására. Ezt követően 1%-os BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, A9647) tartalmú PBS-ben hígított primer ellenanyagot mértünk a metszetekre (1. táblázat). A szöveti minta méretének függvényében 30-80 µl primer ellenanyag került felhasználásra metszetenként. A primer ellenanyaggal befedett metszetek inkubációs ideje 1 óra volt szobahőmérsékleten, nedves kamrában, amelyet 3x5 perc PBS mosás követ. A primer ellenanyagnak megfelelő izotípusú és állatfajú biotinilált szekunder ellenanyagot 1:200 arányban PBS-BSA-ban hígítottunk, melyet a metszetekre mértünk és 45 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, nedves kamrában. Az inkubációs idő lejártával 3x5 perc PBS mosás következett. Az antigén-ellenanyag kötődést peroxidáz enzimmel katalizált színreakcióval mutatjuk ki, ezért fontos volt a szöveti endogén peroxidáz aktivitás blokkolása, amit PBS-el 3%-osra hígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ban (Sigma Aldrich, H1009) végeztük el, 10 percig. A metszeteket 3x5 percig mostuk PBS-ben, majd avidin-biotin peroxidáz komplexet (ABC, Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, PK-6100) mértünk a metszetekre és nedves kamrában 30 percen át, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az ABC-t 1:100 arányban PBS-ben hígítottuk és fél órával összeállítás után mértük a metszetekre. Ezzel egyidőben kloronaftol (4-chloro-1-naftol, Sigma, C8890) törzsoldatot hígítottunk, 50 ml PBS-hez 50 µl kloronaftolt mérve, amit 30 percen át sötétben, mágneses keverőn kevertettünk. Végül a kloronaftolos oldatot átszűrtük és 250 µl 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t adtunk hozzá. Az ABC-vel történő inkubációs idő leteltével a metszeteket 3x5 percig mostuk PBS-ben, majd az előhívás a kloronaftolos oldatban történt (sötétben, 30 percig). Az ellenanyag-ABC komplexhez kötött peroxidáz-enzimaktivitást a kloronaftolnak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében keletkezett kék színreakciója teszi lehetővé. Az inkubációs idő lejártával a metszeteket 3x5 percig PBS-ben mostuk, majd vízzoldékony fedőanyaggal (Aqua-Poly/Mount, Polysciences, 18606-20) fedtük le és 4°C-on tároltuk.

#### *4.2. Kettős immunfluoreszcens festés*

Különböző molekulák jelenlétének ugyanazon metszeten történő vizsgálatára kettős immunfluoreszcens festéseket végeztünk, mely során két különböző izotípusú és/vagy állatfajú primer ellenanyagot és a primer ellenanyagoknak megfelelő izotípusú és állatfajú, fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyagot használtunk fel (2. táblázat).

A metszetek rehidrálását követően az első primer ellenanyaggal 1 órán át inkubáltuk a lemezeket szobahőmérsékleten, nedves kamrában. Ezt követte 3x5 perc PBS mosás, majd fluorokrómmal kapcsolt szekunder ellenanyaggal történő inkubáció, 45 percig. Újabb 3x5



perces PBS mosást követően a metszetekre ráértük a második primer ellenanyagot. Hasonlóan az eddigiekhez, ennek inkubációs ideje is 1 óra, melyet 3x5 perc PBS mosás követett. A második szekunder ellenanyagot úgy választottuk ki, hogy fluoreszcenciája eltérő legyen az első lépésben használt szekunder ellenanyaghoz képest. A 45 perces inkubáció leteltével 3x5 perc PBS mosás következett. A sejtmagok kimutatására 1 µg/ml koncentrációjú DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride, Invitrogen, D1306) reagenst használtunk, melyet PBS-ben hígítottunk és 10 percig sötétben inkubáltuk a metszeteket. Végül a metszeteket 3x5 percig PBS-ben mostuk, majd vízdékony fedőanyaggal lefedtük és 4°C-on tároltuk.

**1.táblázat. Felhasznált primer ellenanyagok listája**

<b>Primer ellenanyagok</b>	<b>Klón neve</b>	<b>Hígítás</b>	<b>Cég/Származás</b>	<b>Izotípus</b>
CD45	HISC7	1:200	Prionics Co.	egér IgG <sub>2A</sub>
csirke B-sejt marker	EIVE-12	felülúszó	Dr. Todd Pharr (USA)	egér IgG <sub>1</sub>
csirke B-sejt marker (Bu-1b)	5-11G	felülúszó	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA	egér IgG <sub>1</sub>
anti-csirke IgM	M2	1:200	Dr. Sonja Hartle, München University	egér IgG <sub>1</sub>
CXCR4	9D9	felülúszó	Dr. Sonja Hartle, München University	egér IgG <sub>2A</sub>
CSF1R	ROS-AV-170	1:80	Dr. Adam Balic, Roslin Institute	egér IgG <sub>1</sub>
TIM4	JH9	1:1000	Dr. Adam Balic, Roslin Institute	egér IgG <sub>1</sub>
csirke dendritikus sejt marker	74.3	felülúszó	DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank)	egér IgG <sub>1</sub>
MHCII	2G11	1:200	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA	egér IgG <sub>1</sub>
E-cadherin	36	1:200	BD Biosciences	egér IgG <sub>2A</sub>
anti-cytokeratin	Lu-5	1:200	Millipore	egér IgG <sub>1</sub>
csirke sejt marker	8F3	1:5	DSHB	egér IgG <sub>1</sub>
anti-réce CD8	-	1:200	Dr. Sonja Hartle, München University	egér IgG <sub>1</sub>

**2.táblázat. Felhasznált szekunder ellenanyagok listája**

<b>Szekunder ellenanyag</b>	<b>Fluorokróm excitációs hullámhossza (nm)</b>	<b>Cég/Származás</b>	<b>Katalógusszám</b>
kecskében termelt anti egér IgG1	594	Thermo Fisher	A21125
kecskében termelt anti egér IgG2A	594	Thermo Fisher	A21135
szamárban termelt anti egér IgG (H+L)	594	Thermo Fisher	A21203
szamárban termelt anti egér IgG (H+L)	488	Thermo Fisher	A21202
kecskében termelt anti egér IgG1	488	Thermo Fisher	A21121
kecskében termelt biotinizált anti egér IgG (H+L)	-	Vector Laboratories	8A-9200

## 5. Félvékony immunhisztokémia

Szemben a leggyakrabban használt 12 µm vastagságú szöveti metszeteken készített immunreakció kimutatással, az 1 µm vastagságú félvékony metszetek különleges beágyazási és metszési lépéseket igényelnek. A sejtek morfológiájának jobb megőrzése érdekében a fagyasztás helyett teljes szöveti, ú.n. „whole-mount” immunfestést alkalmaztunk. A festésekhez 10 napos embriók bursa Fabricii nyirokszerveit izoláltuk és a szervek felnyitását követően 4%-os PFA-ban 2 órán keresztül fixáltuk. A fixált szerveket ezt követően 3x10 percig PBS-ben mostuk, 12 lyukú sejttenyésztő plate-be helyeztük és PBS-BSA-ban hígított primer ellenanyaggal inkubáltuk egy éjszakán át. Az inkubáció 4°C-on, 90 rpm rázatás mellett zajlott. 3x10 perc PBS mosást követően a szerveket 1:200 arányban PBS-BSA-ban hígított szekunder ellenanyaggal inkubáltunk, a primer ellenanyaggal megegyező módon, egy éjszakán át. A szöveti endogén peroxidáz blokkolás és ABC-vel történő inkubáció a fent leírt módon történt a vizsgálni kívánt szövet nagy mérete miatt (peroxidáz blokkolás – 30 perc, ABC – 1 óra). Az előhívás DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate, Sigma-Aldrich, D5637-10G) tartalmú oldatban történik, az 500 µl törzsoldatot (500 mg DAB+10 ml PBS) sötétben

kevertetve feloldottunk 50 ml PBS-ben. Ezután az oldatot leszűrtük és 250 µl 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t adtunk hozzá. Az előhívó oldatot a szervekre mértük, majd 5 percig inkubáltuk, folyamatosan figyelemmel kísérve a színreakció megjelenését. A kötődött peroxidáz enzim aktivitását barna színreakció jelzi. Az előhívás leállítása 3x10 perc PBS mosással történt. Az így elkészült teljes szöveti immunfestett anyagot penicillines üvegbe helyeztük, 4%-os PFA-ban utófixáltuk egy éjszakán át 4°C-on, majd 4% PFA- 4% glutáraldehid tartalmú fixálóban 1:1 arányban újból egy éjszakán át fixáltuk. Végül a PFA-t 4%-os glutáraldehidre cseréltük és a szerveket beágyazásig 4°C-on tároltuk. Ezt követően minden lépést elszívó fülke alatt végeztünk. A beágyazás kezdete előtt a szerveket Milloning pufferrel mostuk, szobahőmérsékleten, 3x5 percig, majd 1%-os ozmium-tetraoxidban (OsO<sub>4</sub>, Merck-B000970) utófixáltuk 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten, melynek hatására a szervek feket színűvé váltak. Az ozmium-tetraoxiddal való munka különös figyelmet igényel, a karcinogén reagens semlegesítése vas-szulfáttal történik. Az utófixálást követően a szerveket desztillált vízzel öblítettük, majd 3x5 percig Milloning pufferben mostuk. A szervek víztelenítése felszálló alkoholsorban történt 50%, 70%, 80%, 90%, 96% etanolban 10 percig, majd abszolút etanolban 3x20 percig. A víztelenítés utolsó lépése 2x5 perc propilénoxidban (Merck, 12492) történő impregnáció. Mivel a propilénoxid oldja a műanyagot ezt a lépést üvegpipettával végeztük. Ezt követően a szerveket propilénoxid – EPON gyanta 1:1 keverékében 45 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd EPON gyantában egy órán keresztül impregnáltuk. Az inkubációs idő leteltével a szerveket gyantával feltöltött gumicsónakokba helyeztük, minél közelebb a leendő metszési felszínhez, majd a kiöntött blokkokat 56°C-os termosztátban 1 napon át polimerizáltattuk. Az beágyazott teljes szöveti immunfestett anyagokat metszést követően 1%-os toluidinkék (Merck, 115930) oldattal kontrasztosítottuk, majd fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk.

## **6. Felhasznált oldatok**

PBS összetétele: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, deszt. víz

Milloning puffer: 830 ml 2,26 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O (Merck, 106462)

170 ml 2,52% NaOH (Merck, 1.06346.1000)

4%-os glutáraldehid: 52,5 ml Milloning puffer

10 ml 25% glutáraldehid (SPI-Chem, 02607-BA)

EPON gyanta keverék: Araldite Resin Grade 6005 (EMS, 10920)

Poly-bed 812 (EMS, 14900)

DDSA (Dodenyl Succinic Anhydride) (EMS, 13710)

NMA (Nadic Methyl Anhydride) (EMS, 19000)

DMP 30 (2,4,6-Tris Dimethyl aminomethylphenol) (EMS, 13600)

## 7. Sejtosztódás vizsgálata EdU jelöléssel

Az embrionális szervekben zajló sejtosztódás vizsgálatára 5-ethynyl-2'-deoxyuridine-t (EdU) használtunk (Click-iT EdU Imaging Kit Alexa Fluor 488, Invitrogen, C10337). Az EdU egy rövid alkin molekulával kapcsolt nukleozid analóg, amely a sejtciklus S-fázisában a replikálódó DNS láncba képes beépülni. A detekciót a DNS láncba beépült alkin nukleotid és az előhívás során a rendszerben jutott aziddal kapcsolt fluoreszcens molekula teszi lehetővé, egy réz-ion katalizálta reakcióban, amely során az alkin-azid kapcsolat létrejön. A módszer egy gyorsabb és a vizsgálni kívánt szövet szempontjából kíméletesebb alternatívát nyújt a BrdU (bromodeoxyuridine) alapú sejtosztódás vizsgálattal szemben.

Az izolált embrionális bursákat EdU-t 1:4000-es hígításban tartalmazó, 38°C-ra előmelegített DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM 1X + GlutaMAX-I, Gibco 31966-021) sejttenyésztő médiumban inkubáltuk. Az inkubáció 38°C-os termosztátban, enyhe ráztatás mellett zajlott két órán át. Ezt követően a szerveket PBS-ben mostuk 3x10 percig, majd a „Minták szövettani feldolgozása” fejezetben leírtak alapján a szerveket fixáltuk, beágyasztuk és metsztük. Az elkészült metszeteken immunfestéseket végeztünk, majd utolsó lépésként elvégeztük az EdU előhívást. A jelöléshez minden alkalommal 500 µl végtérfogatú előhívó oldatot állítottunk össze, amely a következő komponenseket tartalmazta: 430 µl 1X Click iT reaction buffer, 20 µl 100 mM CuSO<sub>4</sub>, 1,2 µl Alexa Fluor azide 488, 50 µl 1x reaction buffer additive 1x-es PBS-ben hígítva. A metszetekre ráértük az előhívó oldatot, 50-70 µl/metszet és 45 percig nedves kamrában inkubáltuk, szobahőmérsékleten. Ezt 3x5 perc PBS mosás követte, majd a sejtmagok jelölésére ez esetben is DAPI-t használtunk, 100 µl/metszet, 10 perces inkubációs idő. A metszeteket 3x5 percig PBS-ben mostuk, majd vízdékony fedőanyaggal lefedtük és 4°C-on tároltuk.

## 8. Chorioallantois membrán transzplantáció

Az embrionális bursa Fabriciit kolonizáló sejtípusok differenciálódásának követésére chorioallantois-membrán (CAM) kimérákat hoztunk létre a korábban leírt módszer szerint (Nagy és mtsai., 2020; Nagy és Goldstein, 2006). A kísérlethez 9 napos embrionális bursa kezdeményeket izoláltunk, penicillin-streptomycin (PenStrep, Sigma P0781) tartalmú steril PBS-ben, amelyeket 11 napos kacsá CAM-ra ültettünk. A megfelelő stádiumú kacsá tojásokon csipesz segítségével egy kis ablakot nyitottunk a légkamra felett, majd egy csepp PenStrep tartalmú steril PBS-t cseppentettünk a héjhártyára. Enyhén megsértve a héjhártyát a steril folyadék bejut a CAM és héjhártya közé, amely lehetővé teszi az utóbbi eltávolítását anélkül, hogy sérüléseket ejtenénk az erekben. Ezt követően kiválasztottunk egy megfelelő „Y” formájú

eret, amelyet papírvatta segítségével traumatizáltunk és az izolált bursa kezdeményeket ráhelyeztük. A tojáson nyitott ablakot leragasztottuk, majd 37°C-on 70% páratartalom mellett a laboratórium keltetőgépeiben inkubáltuk további 7 és 11 napon keresztül. A graftok eltávolítása sztereomikroszkóp alatt történt, amelyeket ezt követően 2., 3. és 4. fejezetekben leírtak alapján dolgoztunk fel.

## **9. Metszetek kiértékelése**

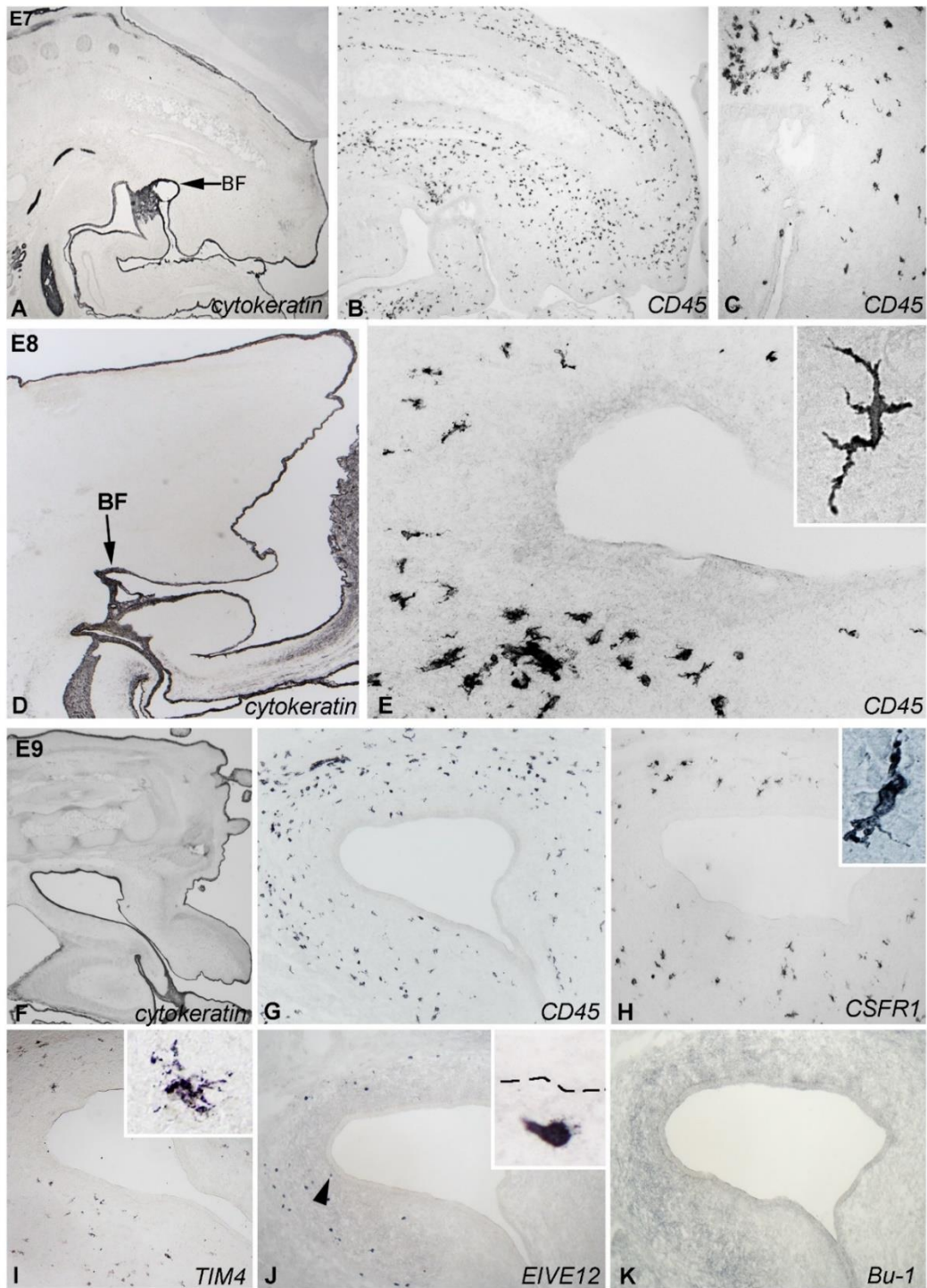
A metszetek kiértékelése fény-, fluoreszcens-, illetve konfokális mikroszkópiás módszerekkel történt. A fény- és fluoreszcens mikroszkópos felvételeket Nikon Eclipse E800-as mikroszkóphoz csatlakoztatott Olympus DP74-es kamerával, a CellSens szoftver segítségével készítettük. A konfokális mikroszkópos felvételek Zeiss LSM 710 típusú pásztázó konfokális mikroszkóppal készültek, a ZEISS ZEN Imaging Software segítségével. A digitális képek feldolgozását ImageJ, illetve Adobe Photoshop CC 2019 programok segítségével végeztük.

## Eredmények és megvitatásuk

### 1. A bursa Fabricii embrionális megjelenése és hematopoetikus sejtek általi kolonizációja

A bursa Fabricii epiteliális telepének megjelenése a csirke embrionális fejlődés 5-7. napján veszi kezdetét. A nyirokszerv jellegzetes struktúrájának kialakulását megelőzi a hematopoetikus sejtek kolonizációja, amely a fejlődés 10. és 15. napja között zajlik. A kolonizációban részt vevő sejttípusok azonosítása érdekében immuncitokémiai módszerekkel végzett megfigyeléseinket az embrionális fejlődés 7. napján kezdtük el, amikor a bursa cytokeratin+ hámtelope kialakul és elkezd benőni a farokbimbó mezenchymájába (1A. ábra). Ebben a stádiumban CD45+ hematopoetikus sejtek nagy száma figyelhető meg elszórtan a farokbimbó mezenchymájában (1B, C ábrák).

A fejlődés 8-9. napjára a bursa lumene kifejezetté válik és a hematopoetikus sejtek nagy számban jelennek meg a fejlődő nyirokszerv hám alatti mezenchymájában (1D, E ábrák). Ezen sejtek között két nyúlványos sejtpopulációt azonosítottunk, melyek közül a CSF1R+ dendritikus sejt prekurzorok nagyobb számban vannak jelen (1H. ábra), míg a TIM4 receptort expresszáló makrofág prekurzorok kisebb számban, a hámtól távolabb helyezkednek el (1I. ábra). Ebben a stádiumban egy másik sejtpopuláció is megfigyelhető a bursa telepében, amelyek az EIVE12 monoklonális ellenanyag által felismert 200 kDa membrán glikoproteint fejezik ki. Az EIVE12+ sejtek nagyobb számban vannak jelen a bursa telepének disztális területén, és néhány sejt megközelíti a felszíni hámot is (1J. ábra). Az ellenanyagot eredetileg a lép ellipszoid-asszociált sejtjei ellen termeltették, azonban hamar kiderült, hogy az ellenanyag számos embrionális és felnőtt szövetben jelöl sejteket, többek között a fejlődő bursa Fabricii telepében, a folliculusbimbók kialakulása előtt (Pharr és mtsai., 1995). A klasszikus bursai kolonizációs modell feltételezi, hogy a toluidinkékkel való sötét festődést mutató és a folliculusok fejlődését elindító sejttípus egy dendritikus sejt prekurzor lehet. A korai bursában megjelenő EIVE12+ sejtpopulációt ezen dendritikus sejt prekurzorokként tartották számon (Nagy és mtsai., 2004; Nagy és mtsai., 2016). Az ellenanyag azonban nem alkalmas a sejtek további sorsának követésére, nem egy sejtvonal specifikus marker mert a később érkező, folliculusbimbókat kolonizáló B-sejtek is expresszálják az EIVE12 antigént a folliculusbimbókba lépést követően (Felfoldi és mtsai., 2015; Pharr és mtsai., 1995). A molekula pontos szerepére máig nem derült fény, úgy gondolják hogy szerepet játszhat a szénhidrát-lektin mediált interakciókban a bursában. Egyes feltételezések szerint a bursai B-sejtek EIVE12 expressziójának megjelenése a bursai dendritikus sejtekből érkező differenciációs szignál hatására jelenik meg (Felfoldi és mtsai., 2015).



**1. ábra. A bursa telepének megjelenése és sejt kolonizációja.** (A) Csirke embrióban a bursa cytokeratin+ epiteliális telepének megjelenése a fejlődés 7. napján figyelhető meg, kapcsolatban állva a proctodeum üregével. (B, C) CD45+ hematopoetikus sejtek eloszlása a farokbimbó mezenchymában. (D, E) CD45+ hematopoetikus sejtek csoportja a bursa telepében a fejlődés 8. napján. (F) A fejlődés 9. napjára a bursa hámtelepének lumene kifejezetté válik. (G) A CD45 pozitívást mutató hematopoetikus sejt populáció nagy számban jelen van a bursa telepében. Ezen sejtek mind nyúlványos, mind kerek morfológiát mutatnak. (H, I) A nyúlványos sejt populációk közül 2 típust különíthetünk el, egyik CSF1, másik TIM4 receptor expressziót mutat. (J) 9 napos embrionális bursában jellegzetes az EIVE12+ sejtek jelenléte és hám közeli elhelyezkedése. (K) Bu-1+ B-sejt prekursor ebben a stádiumban nem figyelhető meg a bursa telepében.

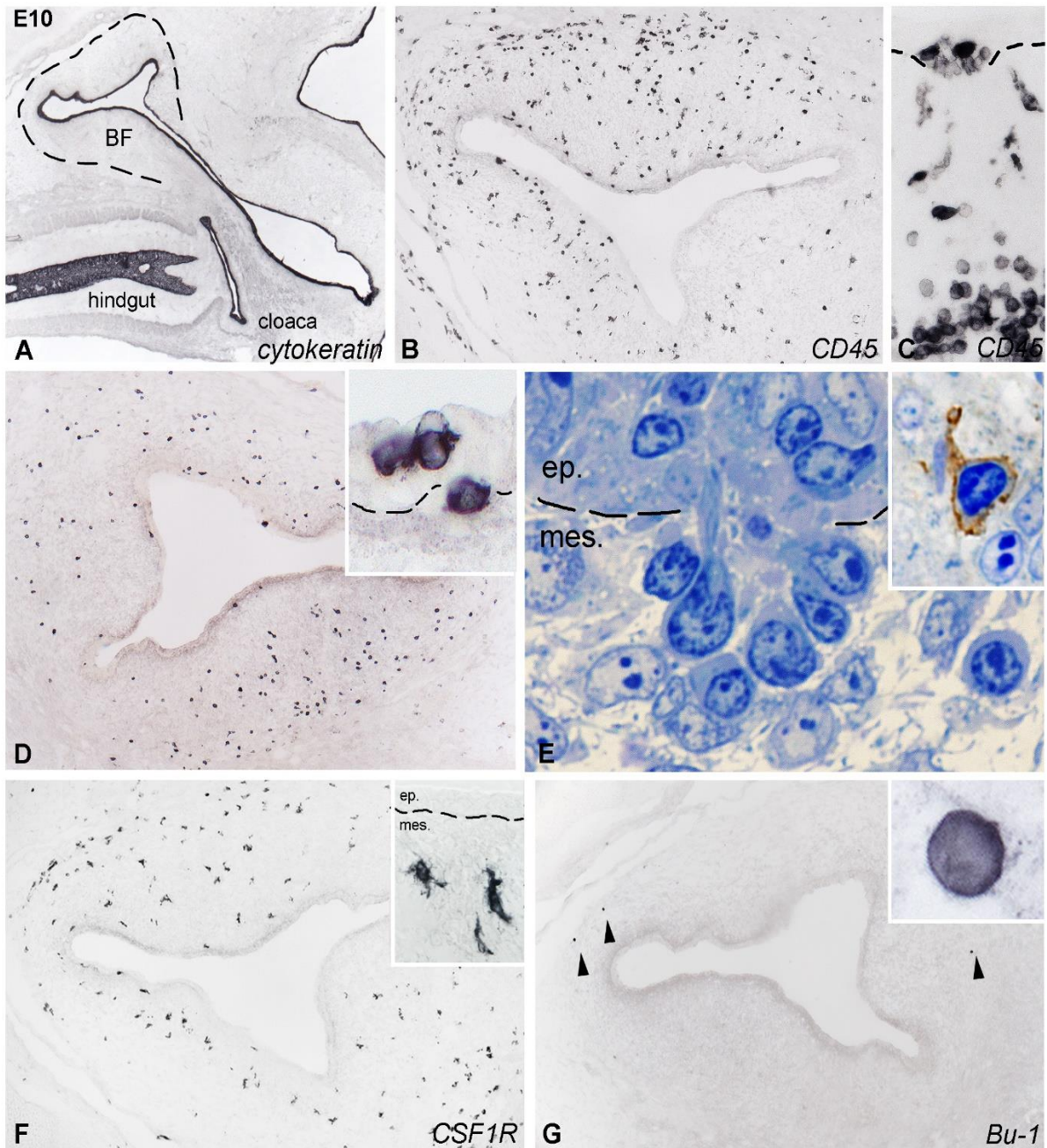
## 2. A bursa epitélium kolonizációja

A bursa folliculusbimbók fejlődésének elindítása kulcsmozzanatot jelent a nyirokszerv fejlődésében. Már régóta ismert, hogy a bursa telepének embrionális megjelenése a hám és mezenchyma interakciójának következménye, azonban a folliculusbimbók kialakulásához a már jelen lévő sejteken kívül szükség van a hematopoetikus sejtekre (Houssaint, 1987; Nagy és mtsai., 2004).

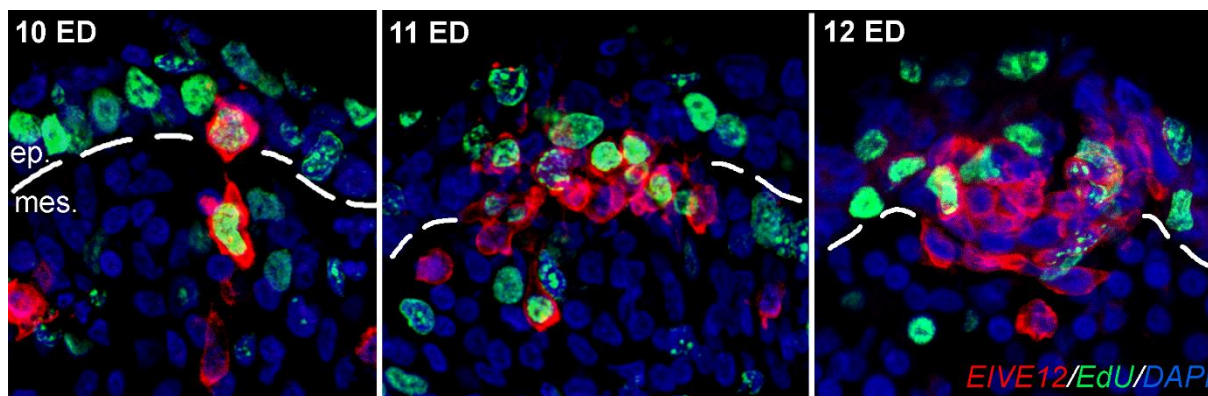
A 10 napos embrionális bursa kezdeményben számos CD45 pozitivitást mutató hematopoetikus sejt figyelhető meg a felszíni hámiban, csoportokat alkotva (2B, C ábrák). Jellegzetes kép, hogy a 10 napos bursában a hámsejtek közé jutó sejtek EIVE12 antigént expresszálnak (2D. ábra). Toluidinkékkel festett félvékony metszetek vizsgálata során a sejtek nem mutatnak jellegzetes sötét vagy világos festődést, azonban expresszálják az EIVE12 antigént (2E. ábra). Ezzel egyidőben a bursa mezenchymális telepében növekvő számban jelennek meg a CSF1R+ nyúlványos sejtek, amelyek a hámhoz egyre közelebb foglalnak helyet. A 10 napos embrióban tudunk először kerek morfológiájú, Bu-1+ B-sejt prekurzorokat kimutatni, ezek azonban kis számban a bursa hámjától távol, a mezenchymában helyezkednek el (2F, G ábrák).

A 10 napos embrionális bursa telep epitél rétegét elsőként kolonizáló EIVE12+ sejtek a hámsejtek intenzív osztódását indukálják (3. ábra). Ezzel a folyamattal esik egybe a folliculuskezdemények megjelenése. EdU+ osztódó sejteket mind a hámsejtek, mind az EIVE12+ sejtek között előfordulnak (3. ábra). Az EIVE12+ sejtek hámba vándorlását irányító molekuláris mechanizmusok jelenleg nem ismertek. Gén és protein expressziós eredmények szerint a 10 napos embrió bursa telepének hám alatti mezenchymája felelős a B-sejt prekurzorok homingjáért (Laparidou és mtsai., 2020; Nagy és mtsai., 2020). Az EIVE12+ sejtek CXCR4 expressziót nem mutattak (nem közölt adat), ami alapján feltételezzük, hogy más molekuláris kölcsönhatások felelősek a hám EIVE12+ sejtek általi kolonizációjáért.





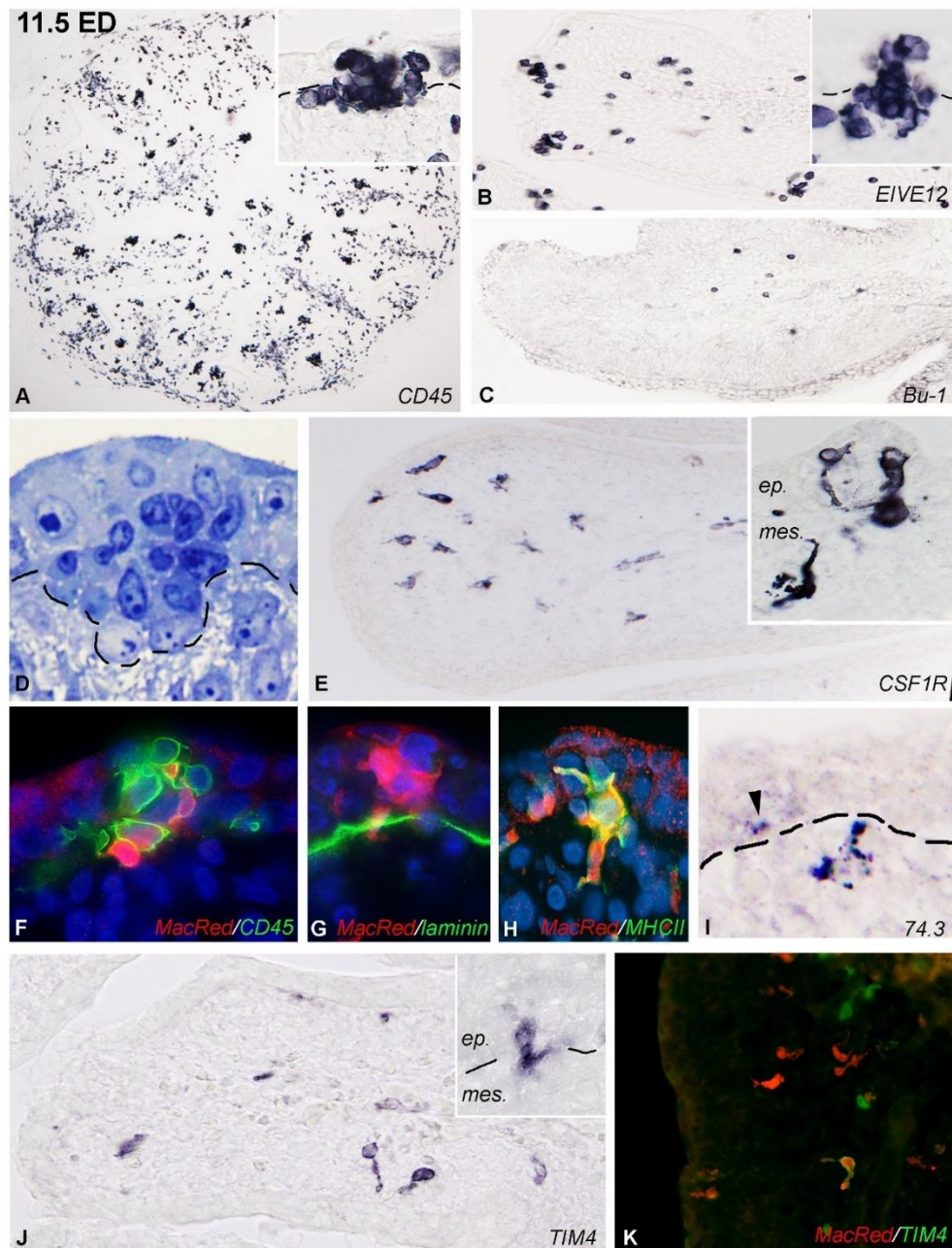
**2. ábra. A folliculusbimbók iniciálása. (A-C).** 10 napos embrionális bursában a CD45+ hematopoetikus sejtek elérik a cytocheratin+ hámot és átlépve a bazális membránt (szaggatott vonal) kialakítják a folliculus kezdeményeket. **(D)** EIVE12+ sejtek eloszlása a 10 napos bursában. **(E)** Félvékony metszeten megfigyelhető sejtcsoport, amely átlépi a bazális membránt. Inset: Félvékony immunhisztokémia, EIVE12 immunreakció. **(F)** CSF1R+ nyúlványos sejtek eloszlása a fejlődő bursa kezdeményben. Nyúlványos sejtek a hám alatti mezenchymában lokalizálódnak. **(G)** Bu-1+ B-sejt prekursorok jelenléte a bursa telepében először a fejlődés 10. napján figyelhető meg.



**3. ábra. EdU+ osztódó sejtek eloszlása az EIVE12+ sejtek epiteliális inváziója során.** Az EIVE12+ sejtek általi kolonizációjával egy időben a hám intenzív osztódása figyelhető meg az embrionális fejlődés 10 napjától kezdve.

### 3. A folliculusbimbók nyúlványos morfológiájú sejtek általi kolonizációja

A bursa fejlődésének 11. napjára számos EIVE12+ sejtekkel tömött folliculusbimbó alakul ki (4A, B. ábrák). A 11.5 napos bursában a redők kifejezetté válnak és ebben a stádiumban figyelhető meg a nyúlványos morfológiájú sejtek nagyobb számú jelenléte a bursa redőkben (4E. ábra). Toluidinkéssel festett félvékony metszeten számos fejlődő hámbimbó azonosítható, amelyekben mind világos, mind pedig sötét festődésű sejtek megfigyelhetők (4D. ábra). A sötéten festődő nyúlványos sejtek hámba való belépését korábban számos madárfajban leírták. Csirkében ez az embrionális fejlődés 10 és 15. napjai között történik (Nagy és mtsai., 2004; Nagy és mtsai., 2016; Oláh és mtsai., 1986). Sötét sejtek hámba vándorlása olyan pontokon figyelhető meg, ahol az EIVE12 sejtek kolonizálták a hámot és a folliculusbimbók fejlődése elindult (4F. ábra). CSF1R transzgenikus állatok bursáját vizsgálva megfigyeltük, hogy a nyúlványos sejtek hámba vándorlásuk idején MHCII pozitivitást mutatnak, valamint jellemző rájuk a bursai szekretoros dendritikus sejtek 74.3 pozitív granulumainak jelenléte (4F-I. ábrák). Megfigyeléseink alátámasztják a korábban leírt dendritikus sejt prekurzorok hámba vándorlásának időpontját és a sejtekre jellegzetes molekulák expresszióját. A későbbi stádiumokban a dendritikus sejtek a folliculusok szerves részeivé válnak, részt vesznek a bursai B-sejt prekurzorok differenciálódásában (Nagy és mtsai., 2020).



**4. ábra. A folliculusbimbók makrofág és dendritikus sejt prekurzorokkal történő kolonizációja. (A)** A bursa lumenét tagoló redők tengelyében és felszíni hámban nagy számú CD45+ hematopoetikus sejt figyelhető meg. **(B)** A bursa redőkben az EIVE12+ sejtek a hámba tömörülnek. **(C)** A fejlődés 11.5 napján Bu-1+ B-sejt prekurzorok jelennek meg a hámtól távol a redők mezenchymális tengelyében. **(D)** Toluidinkékkel festett félvékony metszeten a fejlődő folliculusbimbókban sötét festődést mutató sejtek csoportja azonosítható. **(E)** A bursa redőiben elszórtan előforduló CSF1R+ nyúlványos sejtek elérik a hámat és belépnek a fejlődő folliculusbimbókba. **(F)** A folliculusbimbót kolonizáló CD45+ hematopoetikus sejtek nyúlványos morfológiájú populációja CSF1R-RFP (piros fluoreszcencia) expressziót mutat. **(G)** A CSF1R+ nyúlványos sejtek átlépik a laminin+ bazális membránt és kolonizálják a felszíni hámréteget. **(H, I)** A hámat kolonizáló nyúlványos sejtek a CSF1R expresszió mellett a bursai szekretoros dendritikus sejtekre jellemző MHCII és 74.3 expressziót mutatnak. **(J)** A TIM4 receptort expresszáló makrofág prekurzorok hámba történő belépése a fejlődés 11.5 napjára figyelhető meg. **(K)** 11.5 napos CSF1R-RFP transzgénikus csirke embrióból származó bursa metszeten a TIM4 ellenanyag CSF1 receptort expresszáló sejteket jelöl.

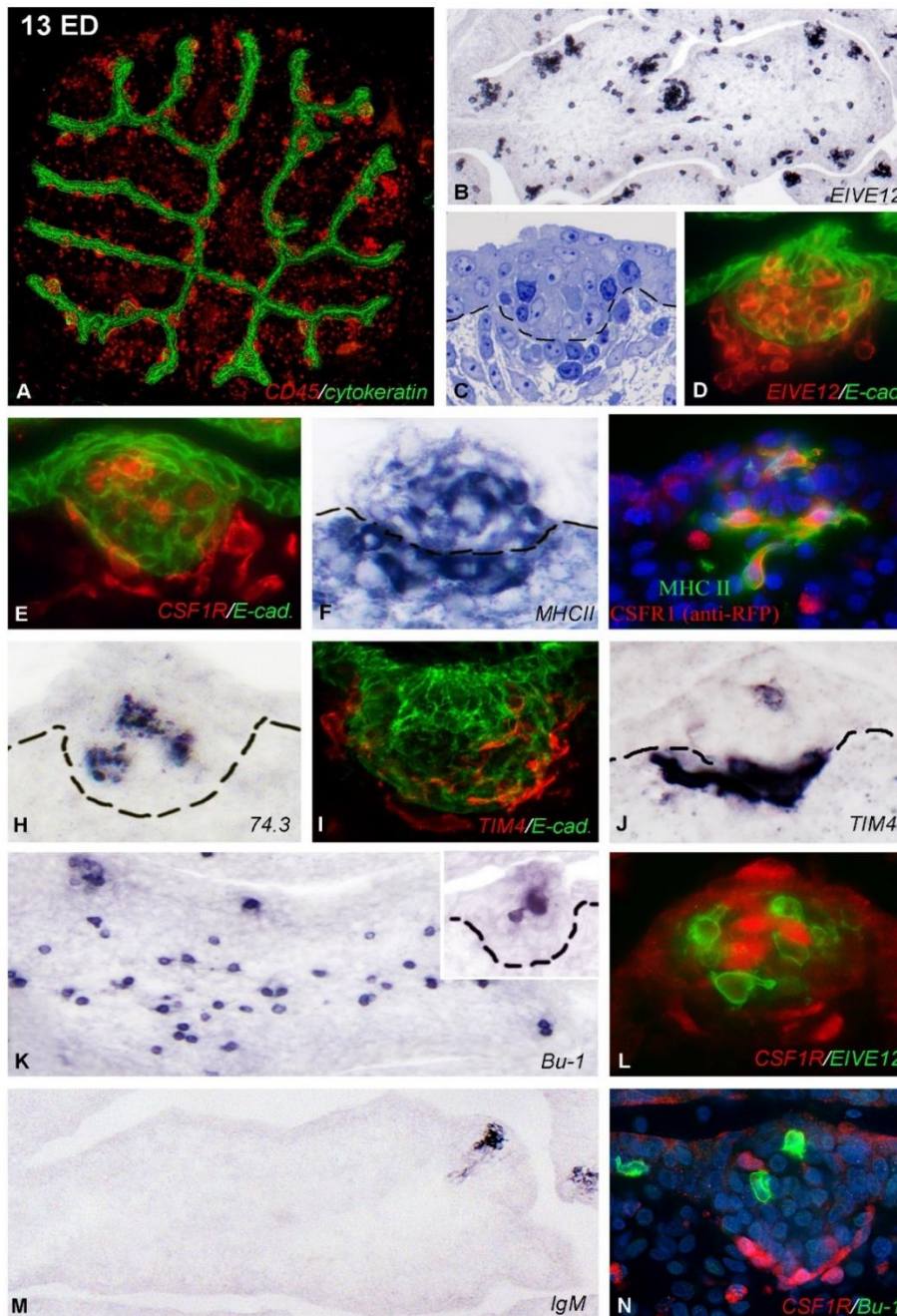
A CSF1R<sup>+</sup> dendritikus sejt prekursorok mellett, TIM4 receptort expresszáló nyúlványos sejteket is azonosítottunk a fejlődő bursa redők tengelyében (4J. ábra). CSF1R transzgénikus madarak bursa Fabricii metszetein megfigyeltük, hogy a CSF1R<sup>+</sup> dendritikus sejt prekursor populáció mellett elszórta CSF1R<sup>+</sup>/TIM4<sup>+</sup> kettősen pozitív sejtek is előfordulnak a hám alatti mezenchymában (4K. ábra.). Feltételezzük, hogy ezek a sejtek a folliculusbimbók kolonizálását követően részt vesznek a bursa makrofág populációjának kialakításában. A CSF1R<sup>+</sup>/TIM4<sup>+</sup> kettősen pozitív sejtek embrionális jelenléte és folliculusbimbókba való belépése összecseng azzal a megfigyeléssel, miszerint a kifejlett bursa kéregállományának makrofág populációjára jellemző ezen receptorok jelenléte (Nagy és mtsai, nem publikált megfigyelés). Immuncitokémiai adatok alapján feltételezzük, hogy a bursai nyúlványos sejtek két külön populációként érkeznek a fejlődő bursa telepébe és nem egyetlen mieloid prekursor sejt szétválásaként alakul ki a folliculusok denditikus sejt és makrofág populációja.

#### **4. A folliculusbimbók B-sejtes kolonizációja**

Az embrionális fejlődés 13. napjára a fejlődő bursa redők kifejezetté válnak, kitöltik a nyirokszerv lumenét és a redőkben a CD45 hematopoetikus sejteket tartalmazó folliculusbimbók száma jelentősen megnő (5A. ábra). A folliculusbimbók megjelenése egy szekvenciális folyamatot képvisel, így a CD45<sup>+</sup> EIVE12<sup>+</sup> sejteket tartalmazó folliculusbimbók heterogén fejlettséget mutatnak a fejlődés 13. napjára (5B-D. ábrák). EIVE12<sup>+</sup> sejtek mellett CSF1R<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>/74.3<sup>+</sup> dendritikus sejtek és TIM4<sup>+</sup> makrofágok kolonizációja is megfigyelhető (5E-J. ábrák). Az így kialakuló mieloid sejteket befogadó folliculáris mikroörményzet képessé válik a bursát kolonizáló B-sejt prekursorok fogadására.

A 13. napon a bursa redők tengelyében számos Bu-1<sup>+</sup> B-sejt prekursor figyelhető meg, amelyek a fejlődő folliculusbimbókat kolonizálva kialakítják a folliculusok végleges sejtes összetételét (5K, M. ábrák). A folliculusbimbókban IgM expresszió rajzolódik ki. Eredményeink alátámasztják azon korábbi megfigyeléseket, miszerint a B-sejt prekursorok bursa folliculusokba történő migrációja az utolsó lépést képviseli a folliculusbimbók sejtes kolonizációja tekintetében (Nagy és mtsai., 2020). Azon molekuláris mechanizmusok és szolubilis faktorok azonban, amelyek a B-sejtek folliculusbimbókba való migrációját irányítják nem teljesen tisztázottak. Nemrég megjelent publikációk szerint a B-sejt prekursorok embrionális bursába való migrációját a CXCR4-CXCL12 kemokin páros irányítja. A jelátvitel blokkolása esetén a hám bimbók kialakulása és ezek CSF1R<sup>+</sup> dendritikus sejt prekursorok általi kolonizációja megtörténik, azonban a Bu-1<sup>+</sup> B-sejtek hiányoznak a folliculusokból. A B-sejt

prekurzorok follikulusbimbókba való vándorlásáért azonban ez a mechanizmus nem tehető önmagában felelőssé, hiszen a bursában jelen lévő szintén CXCR4 pozitív granulociták follikulusbimbókba történő vándorlása nem figyelhető meg (Laparidou és mtsai., 2020; Nagy és mtsai., 2020). A folyamatot irányító molekulák közül előtérbe kerülhet a CXCL13-CXCR5 és CCL20-CCR6 kemokin-receptor páros hiszen mindkét molekula kifejeződik a madarak nyirokszerveiben is (Kaiser és mtsai., 2005).



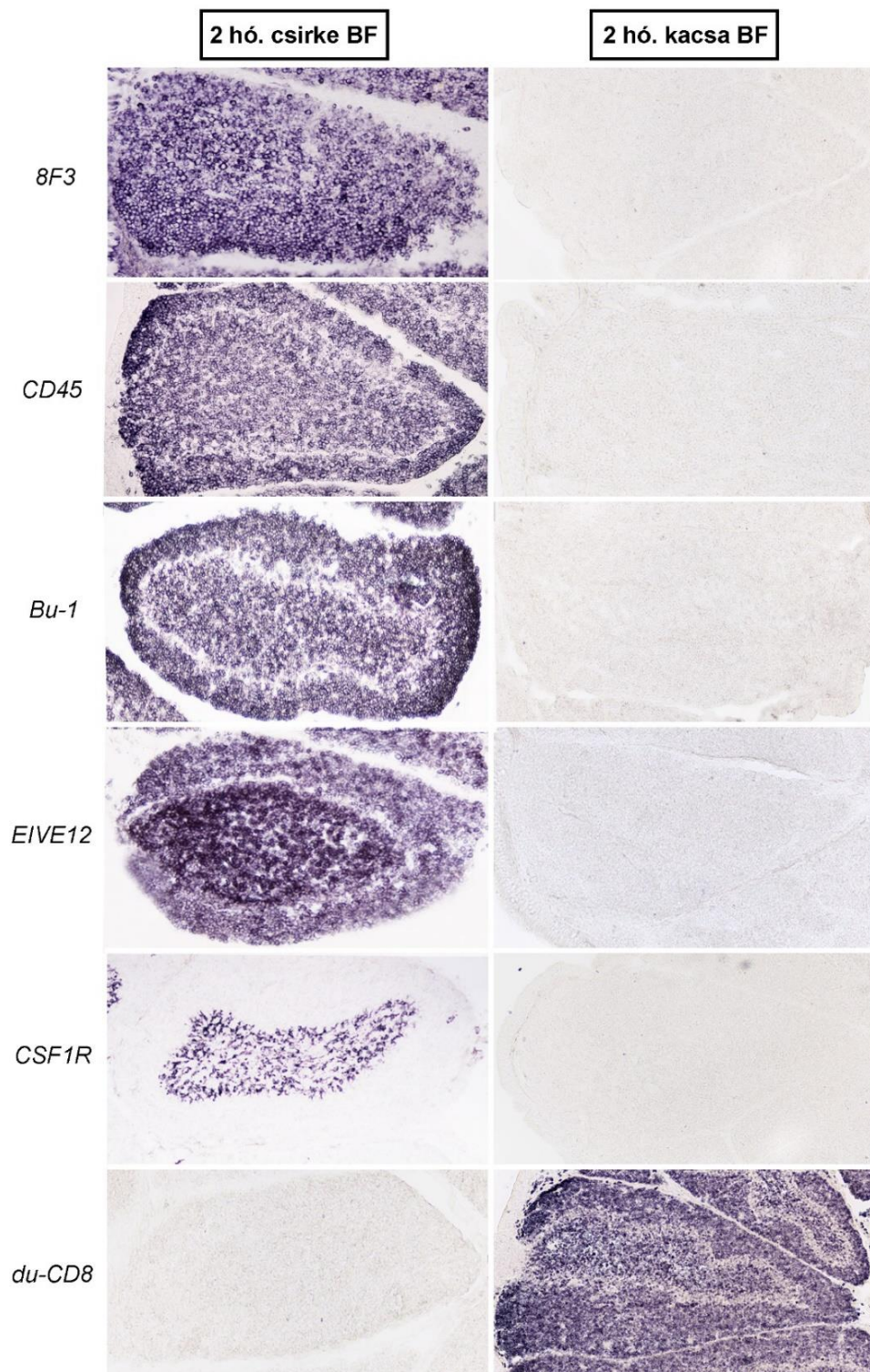
**5. ábra. A follikulusbimbók B-sejtekkel történő benépesülése. (A)** A fejlődés 13. napjára a bursa redőiben számos CD45+ sejtekkel tömött cytokeratin+ follikulum van jelen. **(B,D)** A follikulusbimbók indukcióját követően az osztódó EIVE12+ sejtek kitöltik a cytokeratin+ hámbimbókat. **(C)** 13 napos follikulum kezdemény toluidinkékkel festett félvékony

metszetében, a hámot kolonizáló sötét sejtek elkülönülnek a világosan festődő epitél sejtektől. **(E-J)** A folliculáris mikroölyezet kialakításában részt vevő nyúlányos sejtpopulációk: CSF1R+/MHCII+/74.3+ dendritikus sejtek és TIM4 receptort expresszálo makrofágok. **(K)** A fejlődés 13. napjára a Bu-1+ B-sejt prekursorok nagy számban jelennek meg a bursa redők tengelyében és a folliculusbimbókban. **(M)** A folliculusokat kolonizáló B-sejtek felszíni IgM-et expresszálnak. **(L,N)** A folliculusbimbók CSF1R+, EIVE12+ és Bu-1+ limfoid sejteket tartalmaznak.

## **5. A bursa Fabriciiit kolonizáló sejttípusok differenciálódásának követése csirke-kacsa kiméra technikával**

Immuncitokémiai adataink szerint a bursa embrionális telepét kolonizáló EIVE12+ sejtek hámba vándorlása egybeesik a folliculusok fejlődésének elindításával. A hámot kolonizáló EIVE12+ sejtek sorsát a fejlődés előrehaladtával azonban számos kérdés övezi. Az EIVE12 nem tekinthető sejtvonal specifikus markernek mert a későbbiekben a folliculusokat kolonizáló B-sejteken is megjelenik. Kikelés után a lép ellipszoid sejteken, valamint a plazmasejteken is kimutatható (Felfoldi és mtsai., 2015). Figyelembe véve, hogy a csirke embrió bursa Fabricii telepében az EIVE12+ sejtek a fejlődés 9. napján jelennek meg együtt a CSF1R+ és TIM4+ nyúlányos sejtekkel felmerül annak a lehetősége, hogy az EIVE12+ sejtek a CSF1R+/TIM4+ mieloid sejtek differenciálatlan alakjai. Ezt a feltételezést erősítették azok a korábbi publikációk, amelyek a korai bursában megjelenő EIVE12+ sejteket dendritikus sejt prekuzornak határozták meg (Nagy és mtsai., 2004; Nagy és mtsai., 2001; Oláh és Nagy, 2013). Egy másik elképzelés szerint az EIVE12+ sejtek elkötelezetlen limfoid sejtvonalat képviselnek. Ezt támogatja az a tény, hogy az EIVE12 antigén Bu-1+ B-sejteken is rajta van (Pharr és mtsai., 1995). A Bu-1+ B sejt prekursorok azonban hiányoznak a bursa telepéből, ezen sejtek bevándorlása csak a 10-11. napos embrionális stádiumban veszi kezdetét. A kilenc napos B-sejt prekuzor mentes bursa kezdemény tökéletesnek bizonyul olyan embriómanipulációs kísérletek elvégzéséhez, amely kerek morfológiájú CSF1R-/Bu-1-/EIVE12+ sejtek sorstérképezését tűzi ki célül.

Embrionális kiméra technikát alkalmazva 9 napos embrionális bursa kezdeményt ültettünk megfelelő fejlődési stádiumú 11 napos kacsa embrió chorioallantois-membránra (CAM). A fejlődési stádiumok összehangolására Li és munkatársai által megállapított paramétereket követtük (Li és mtsai., 2019). A CAM megfelelő környezetet biztosít a graftok továbbfejlődésére (Nagy és mtsai., 2020), azáltal hogy vaszkularizáció révén biztosítja a szövet táplálását és kacsa eredetű sejtekkel való kolonizációját. A kiméra embriókat 7-11 napig inkubáltuk és a kimérizmust csirke limfomielioid sejtekre és kacsa limfoid sejtekre specifikus ellenanyagokkal vizsgáltuk (6. ábra).

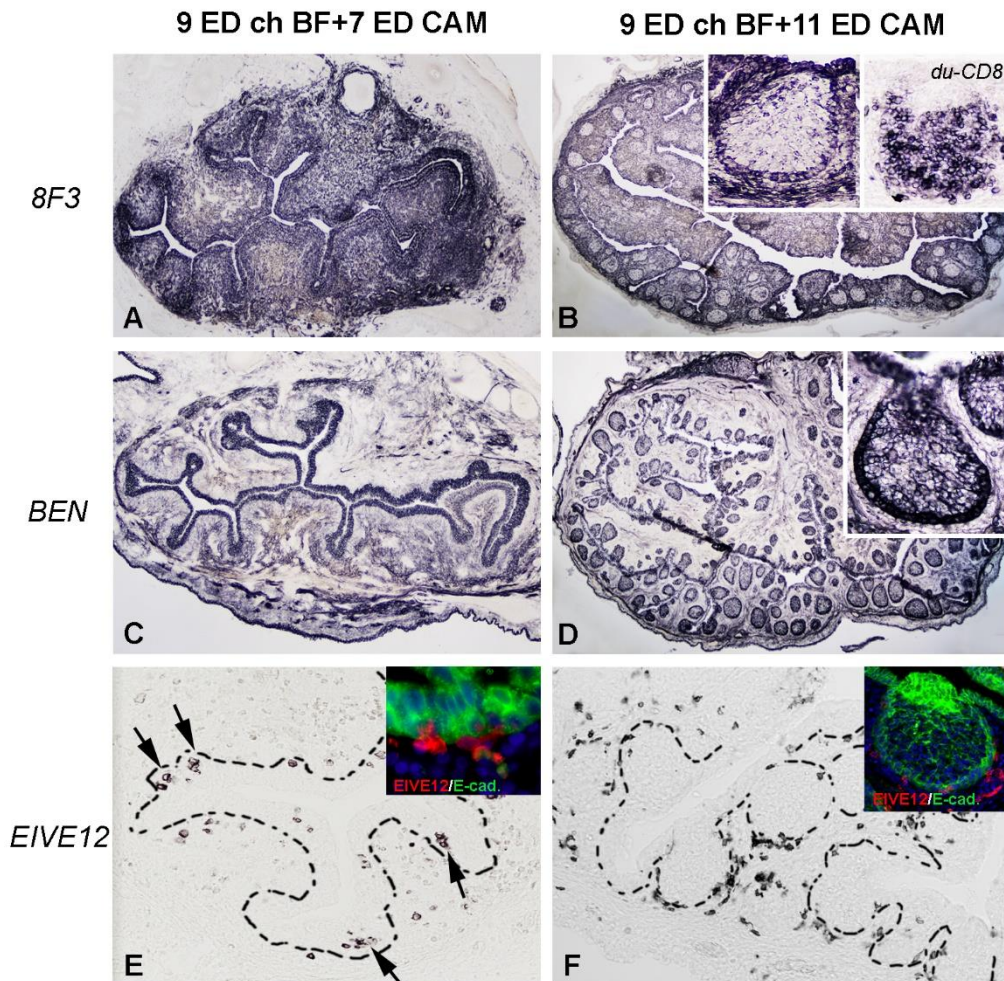


**6. ábra. A kimérák kiértékelésére használt fajspecifikus ellenanyagok.** A kimérizmus kiértékelésére használt limfomioid sejtekre jellemző ellenanyagokat csirke és kacs bursa Fabricii metszetein teszteltük, hasonlítottuk össze. A **8F3** ellenanyag valamennyi csirke sejtet felismeri, kacs sejtekkel nem keresztreakál. **CD45**: csirke specifikus hematopoetikus sejt marker, **Bu-1**: csirke specifikus B-sejt marker, **EIVE12** ellenanyag nem jelöli a kacs bursa sejteket, **CSF1R**: csirke dendritikus sejt marker, **du-CD8**: kacs leukocita és limfocita marker. A kacs B-sejtek kifejezik a CD8 receptort (Kothlow és mtsai., 2005).

7 nappal a transzplantációt követően megfigyelhető, hogy a BF epitéliumra specifikus BEN molekulát kifejező hám telepe tovább fejlődött, a bursa redők kialakultak (7A, C. ábrák.). Csirke hematopoetikus sejtek nagy számban vannak jelen a nyirokszerv telepében és számos sejtcsoport figyelhető meg a felszíni hám szintjén. Az EIVE12+ sejtek jelen vannak a bursa telepében és a korábbi embrionális bursa kezdemények fenotípusához hasonlóan kolonizálták a hámsejteket (7E. ábra).

11 nappal a graftok transzplantációját követően számos, a redőt kitöltő folliculus differenciálódott. 8F3 immunreaktivitás a csirke eredetű epitélium és mezenchymális szöveti területeket jelöli. A 8F3+ csirke bursa folliculusok hámretikulumát a fogadó kacsza embrió CD8+ sejtjei kolonizálták (7B, D. ábrák). Az EIVE12+ sejtek jellegzetes eloszlást mutatnak a fejlődő bursában, a korai stádiummal ellentétben, amikor a sejtek a fejlődő folliculusbimbókban tömörültek, a fejlettebb folliculusok velőállományában csak elszórtan találunk EIVE12+ sejteket. Az EIVE12+ sejtek többnyire a fejlődő folliculusok közötti kötőszövetes térben figyelhetők meg (7F. ábra). A morfológiai kép alapján feltételezzük, hogy az EIVE12+ sejtpopuláció, hasonlóan az emlősökben leírt limfoid szövet indukáló (LTi) sejtekhez a folliculusbimbók iniciálását követően egy tranzienst populációt képvisel. Emlősökben az LTi sejtek életideje 22-26 nap, nem képeznek maradandó sejtpopulációt a kifejlett nyirokszervekben. Két héttel születést követően csontvelő eredetű őssejtek népesítik be az LTi sejtekkel indukált kifejlett nyirokszerveket (Simic és mtsai., 2020). Az embrionális és posztnatális LTi sejtek közötti funkcionális különbségek nem ismertek, azonban a lép akut gyulladását követő regenerációjában beszámoltak ezen adult LTi sejtek szerepéről (Scandella és mtsai., 2008). Érdekes lehetne a továbbiakban az EIVE12+ sejtek vizsgálata kifejlett bursa Fabricii-ben, ezek eloszlásának és funkciójának pontosabb leírása olyan a bursa szerkezetét és működését károsító vírusfertőzés esetén, mint a fertőző bursitis, amit az *infectious bursal disease virus*, IBDV, más néven a Gumboro vírus okoz. Azok a vírusfertőzött madarak, amelyek túlélnek a fertőzés akut fázisát felépülést mutatnak a bursa szöveti szerkezetének szintjén, a folliculusok regenerálódnak visszanyerik IgM+ B-limfocita populációjukat és a bursa morfológiája hasonlóvá válik a fertőzés előtti állapothoz (Sharma és mtsai., 2000).



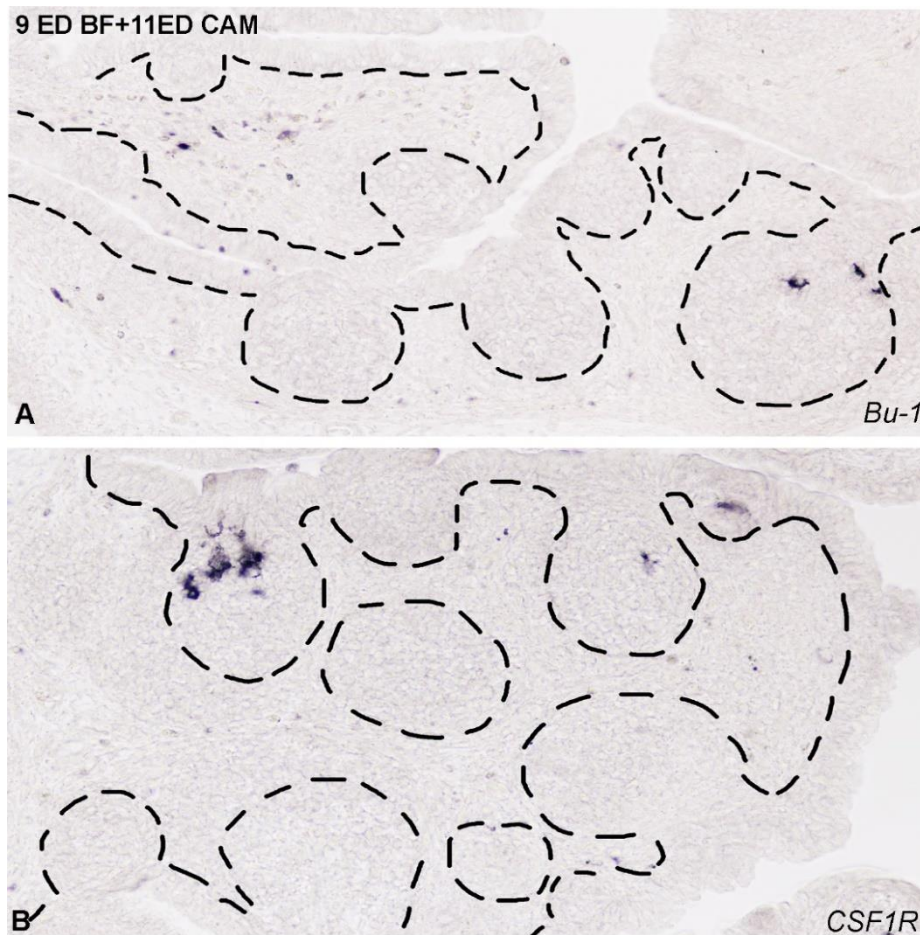


**7. ábra. Csirke-kacsa bursa kiméra.** Az EIVE12+ sejtek kísérletes tanulmányozására EIVE12+ sejtekkel kolonizált Bu-1+ B-sejteket nem tartalmazó csirke bursa Fabricii kezdeményeket 11 napos kacsa embrió CAM-ra transzplantáltunk. (A) 7 nappal transzplantációt követően a 8F3 csirke sejtekre specifikus marker a fejlődő bursa hámmезenchyma telepét jelöli. (C) A csirke bursa epitélium specifikus BEN nevű ellenanyag kirajzolja a bursa hámrétegét. (E) 7 nappal transzplantációt követően a transzplantált graftban átvitt EIVE12+ sejtek kolonizálják az E-cadherin+ hámot és elindítják a folliculusok fejlődését. (B, D) 11 nappal az inkubációt követően a bursa redői kifejezetté válnak, amelyekben számos hámbimbó fejlődik (jobb oldali beillesztett kép). A folliculusokat CD8 pozitív kacsa eredetű leukociták népesítik be. (F) A fejlődő folliculusokban elszórtan található EIVE12+ sejtek.

A transzplantált bursa folliculusok részletes immuncitokémiai vizsgálata szerint a CSF1R+ nyúlványos, illetve Bu-1+ B-sejtek kis számban, néhány folliculus velőállományában fordulnak elő, egyik sejt típus esetén sem alakult ki a teljes folliculus. Kerek morfológiájú Bu-1+ sejteket egy esetben sem tudtunk megfigyelni, amely igazolja azt, hogy a graft átültetésekor ez nem tartalmazott Bu-1+ B-sejt prekurzorokat. Ugyanakkor elszórtan egy-két folliculusban megfigyelhetünk néhány Bu-1+ nyúlványos sejtet, ezek azonban nagyon kis számban vannak jelen (8A. ábra) és feltételezzük, hogy a korábban leírt bursai Bu-1+ makrofág alpopulációhoz

tartoznak (Houssaint és mtsai., 1987). A fejlődő folliculusok velőállományában elsősorban CSF1R+ nyúlványos sejteket is kimutattunk (8B. ábra). Feltételezzük, hogy a folliculusokban található nyúlványos sejtek a transzplantált CSF1R+ sejtek leszármazottai.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy az embrionális bursa telepében jelen lévő kerek morfológiájú EIVE12+ sejtek nem tekinthetők B-sejt és dendritikus sejt prekursoroknak, ezen sejtek nem vesznek részt a kifejlett folliculusok mieloid és limfoid sejtpopulációjának kialakításában, nem alkotnak fennmaradó sejtpopulációt a folliculusok velőállományában. Ennek alapján azt gondoljuk, hogy a CSF1R-/Bu-1-/EIVE12+ kerek morfológiájú sejtek átmeneti populációt képeznek a bursa korai fejlődése során, aminek elsődleges szerepe a hám kolonizációja és a folliculusbimbók fejlődésének elindítása.



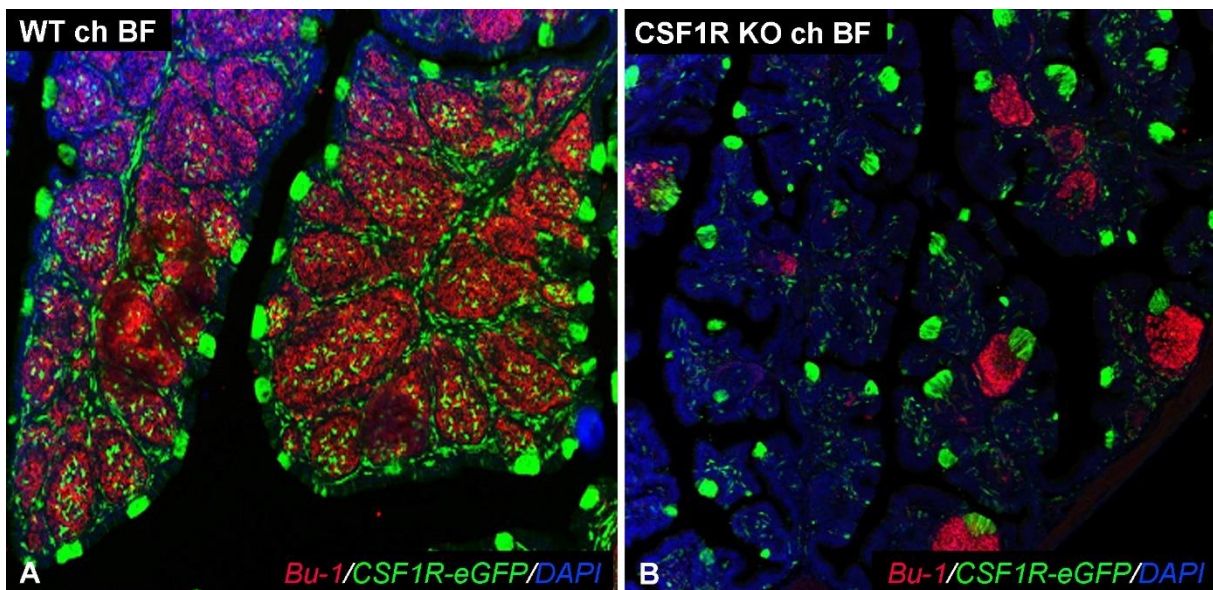
**8. ábra.** Kacsa chorioallantois membránra transzplantált csirke bursa Fabricii (A) Bu-1+ és (B) CSF1R+ sejtpopulációja.

## Következtetések

Szaktervizelési munkámban a madarak jellegzetes primer nyirokszervében, a bursa Fabricii-ben zajló folliculogenezis karakterizálását tűztem ki célul. Első lépésben a bursa epithelialis telepét kolonizáló hematopoetikus sejttípusok fenotípusát karakterizáltuk immuncitokémiai és immunelektronmikroszkópiai módszerekkel, valamint a limfoid folliculusok ontogenezisét elindító mieloid és stromális sejtek immuncitokémiai és hisztológiai tanulmányozását végeztük el. Kilenc napos bursa Fabricii kezdeményben az EIVE12 monoklonális ellenanyaggal azonosítható kerek morfológiájú sejtcsoport az első, amely megközelíti a felszíni hámot és a 10 napos bursában elsőként felelős a hám kolonizálásáért. Az EIVE12 sejtek hámba vándorlását követően, 24 órával később CSF1R+ és TIM4+ nyúlványos sejtek azonosíthatók nagy számban a bursa telepében. A nyúlványos sejtpopulációk a bursai dendritikus sejt és makrofág prekursoroknak tekinthetők, amelyek a fejlődés 11. napján kolonizálják a fejlődő folliculusbimbókat. Megválaszolatlan kérdés marad, hogy a folliculusbimbók CSF1R-/TIM4+ makrofág és CSF1R+/TIM4- dendritikus sejtpopulációja önállóan kolonizálja-e a folliculusbimbók hámtelepét vagy CSF1R+/TIM4+ prekursor követi második sejtvonalként az EIVE12+ sejtek belépését. A 13 napos embrionális bursában számos EIVE12+ sejtekkel tömött és nyúlványos sejtpopulációval is rendelkező folliculuskezdemény figyelhető meg, amelyek képessé válnak a bursába érkező Bu-1+ B-sejtek fogadására.

Az EIVE12 sejtpopuláció szerepének pontosabb meghatározása érdekében, kiméra technikával kimutattuk, hogy a folliculusok ontogenezisét elindító EIVE12+ sejtek az eddigi elképzelésekkel ellentétben nem tekinthetők dendritikus sejt vagy B-sejt prekursoroknak. Feltételezzük, hogy az EIVE12+ sejtek elsődleges szerepe a hám kolonizálása és ezzel a folliculusok fejlődésének elindítása, de a fejlődésben előrehaladott folliculusok szintjén nem alkotnak maradandó sejtpopulációt. Hipotézisünket tovább erősítik azok a CSF1R génkiütött állatokkal végzett kísérletek, amelyek eredményei szerint CSF1R nyúlványos sejtpopuláció nélkül a bursai folliculusbimbók iniciálása elindul, felhívva a figyelmet egy ezt megelőző sejtpopuláció létezésére. Továbbá ez a kísérlet alátámasztja azt az elképzelésünket, hogy az EIVE12+ sejtek a CSF1R+ nyúlványos sejtek nélkül is képesek a folliculusbimbók fejlődésének elindítására. A CSF1R transzgenikus csirkék bursája jó modellt jelenthet a továbbiakban a bursai dendritikus sejt prekursorok folliculogenezisben játszott szerepének tanulmányozására (Balic és mtsai., 2014). Fontos információkkal szolgálna a folliculusok fejlődésének vizsgálata olyan mutáns háttérben, amelyben hiányoznak a bursai szekretoros dendritikus sejtek. Erre adna lehetőséget a CSF1R gén kiütése, amelyre kollaborációban számos

próbálkozás zajlik az edinburgh-i Roslin Intézetben. Előzetes eredmények alapján elmondható, hogy a CSF1R gén mieloid sejtekből történő kiütése esetén, a bursából hiányoznak a szekretoros dendritikus sejtek és a folliculusok B-sejtes kolonizációja is zavart szenved. Ezekben a mutáns törzsekben a folliculus asszociált epitélium (FAE) szintén CSF1R expressziót mutat hasonlóan a vad típushoz (Balic és mtsai., 2019). Génkiütött háttérben a hámbimbók fejlődése nem szenved zavart, a FAE-ben jelen lévő CSF1R expresszió kirajzolja a redőkben lévő folliculusok számát, minden kifejlett folliculus egy FAE-vel rendelkezik. Ezen folliculusok közül azonban csak elszórtan figyelhetünk meg Bu-1+ B-sejt állománnyal rendelkező folliculusokat (1B. ábra). Kikelést követően a B-sejtek nagy mértékű apoptózison esnek át, majd az egyedek 2 héttel kikelést követően elpusztulnak. Génkiütött háttérben a folliculusok fejlődése elindul, ezen folliculusok B-sejtekkel történő kolonizációja azonban zavart szenved. A B-sejtek éréséhez és a funkcionális nyirokszerv kialakításához elengedhetetlen a CSF1R+ szekretoros dendritikus sejtek jelenléte. Ez arra enged következtetni, hogy a CSF1R+ nyúlványos sejtek önmagukban nem játszanak kulcsfontosságú szerepet a folliculogenezis elindításában, azonban további fejlődési lépések igénylik ezen sejtek jelenlétét.

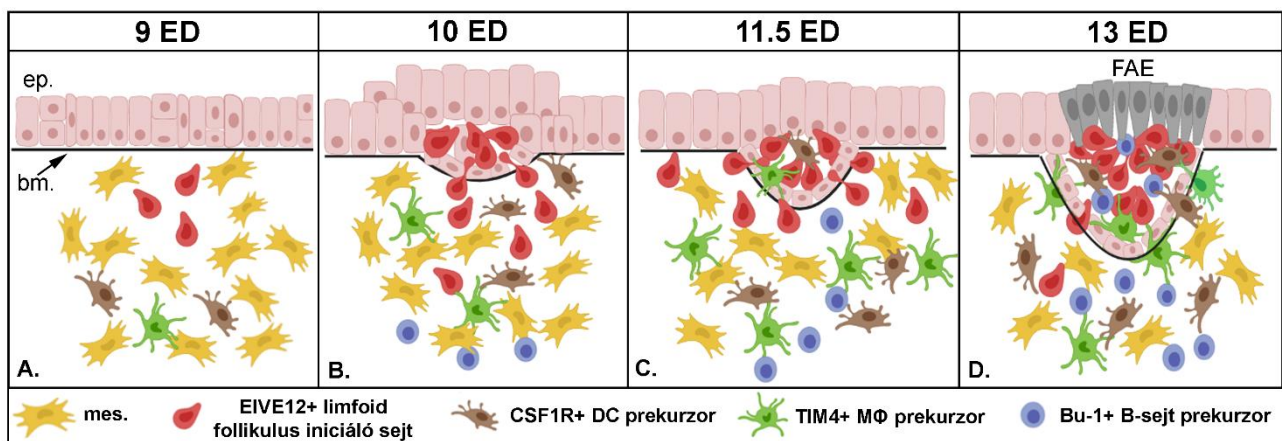


**1. ábra. Kifejlett bursa folliculusok képe és CSF1R génkiütött csirkék felnőtt bursa folliculusainak összehasonlítása. (A)** Vad típusú (WT) háttérben a bursa folliculusok CSF1R+ dendritikus sejt és Bu-1 pozitív B-sejt állománnyal rendelkeznek. A CSF1R gén expressziója megfigyelhető a folliculus asszociált epitélium (FAE) szintjén is. **(B)** A CSF1R gén mieloid vonalból történő célzott kiütése esetén a FAE CSF1R expressziója megmarad, azonban a folliculusok CSF1R+ nyúlványos sejtpopulációja nagymértékű csökkenést mutat. A folliculusok B-sejtes kolonizációja zavart szenved, Bu-1+ B-sejt állománnyal rendelkező folliculusok csak elszórtan figyelhetők meg.

A bursai limfoid folliculusok fejlődésének elindítása a klasszikus modell szerint két lépésben zajlik: **(1)** az embrionális fejlődés 10-15. napja között dendritikus sejt prekursorok kolonizálják a hámot és egy dendro-epiteliális szövet kialakításával indukálják a folliculusbimbók fejlődését, **(2)** a folliculuskezdeményeket Bu-1+ B-sejt prekursorok kolonizálják (Masteller és mtsai, 1995; Houssaint, 1987; Nagy és mtsai., 2010; Oláh és Nagy, 2013).

Immuncitokémiai és embriómanipulációs kísérleteink rámutattak, hogy az embrionális fejlődés 10. napján megjelenő EIVE12+ sejtek elengedhetetlenül szükségesek a hámbimbók kialakulásához. Megfigyeléseink alapján egy új bursai őssejt kolonizációs modellt javasolunk, amely több lépésben alakítja ki a folliculuskezdemények végső sejtjes összetételét: **(1)** az EIVE12+ „limfoid folliculus iniciáló” sejtek felelősek a bursa hámjának több pontján történő indukciójához és a folliculusbimbók fejlődésének elindításához az embrionális fejlődés 10. napján (2A,B. ábrák), **(2)** ezt követően történik meg a hámbimbók kolonizációja a később érkező CSF1R+ és TIM4+ mieloid sejtpopulációk által (2C. ábra), **(3)** végül az embrionális fejlődés 13. napján Bu-1+ B-sejt prekursorok kolonizálják a folliculusbimbókat (2D ábra).

Következő kísérleti terveinként szerepel az EIVE12 sejtpopuláció bélhez-asszociált nyirokszervekben történő komparatív vizsgálata, illetve azon molekuláris faktorok azonosítása, amelyek meghatározó szerepet töltenek be a folliculusbimbók hematopoetikus kolonizációjának kialakulásában.



**2. ábra.** A fejlődő bursa Fabricii epitélium sejtjes kolonizációjának javasolt modellje. ep.-epitélium, bm.-bazális membrán, mes.- mezenchyma sejt, DC- dendritikus sejt, MΦ- makrofág, FAE- folliculus-asszociált epitélium.

## Összefoglaló

A bursa Fabricii (BF) a madarak bélhez-asszociált primer nyirokszerve, a B-limfociták proliferációjának, differenciálódásának, az immunrepertoár kialakulásának helye. Az embrionális fejlődés kezdetén a BF epiteliális telepe a kloáka disztális, ektoderma-eredetű szakaszából indul ki. Az organogenezis idején a BF hámkezdeményét vastag mezenchymális sejtréteg borítja, amelyet vér eredetű őssejtek (B-limfocita, makrofág és dendritikus prekursorok) népesítenek be. A véreredetű mieloid prekursorok a mezenchymában a hámsejteket follikulusbimbók képzésére készítik. A B-limfocita prekursorok további differenciálódását a BF follikulusokat alkotó dendritikus-, makrofág-, és hámretikulum sejtekből álló mikrokörnyezet határozza meg. A stromális mikrokörnyezet jelentősége a lymphopoiesisben főleg az őssejtek differenciálódását irányító növekedési faktorok és citokinek felfedezésével értékelődött fel.

Jelen munkánk során hisztológiai és immuncitokémiai módszerrel tanulmányoztuk a mieloid sejtek megjelenését és differenciálódását, amelyek elindítják a BF limfoid follikulusainak ontogenezisét a B-sejtek bejutása előtt. A 9 napos csirke embrióban az EIVE12 monoklonális ellenanyag (mAb) a hám alatti mezenchymában kis csoportokat képező kerek sejteket jelöl, melyek hámba vándorlását követi a follikulusok kezdeményét alkotó hámbimbók megjelenése. Egy nappal később, CSF1R+, illetve TIM4 receptorokat expresszáló nyúlványos sejtek kolonizálják a hámbimbókat, amiben 24-48 órával később CXCR4+/chB6+/IgM+ B-sejt prekursorok telepednek meg. Az embrionális fejlődés előrehaladtával a CSF1R+, illetve TIM4+ sejtek száma megnő, és a 16-18 napos embrió follikulusaiban már dendritikus, valamint makrofág morfológiát mutatnak. Kikelést követően a BF-ben képződő chB6+ B-limfociták a perifériára vándorolva a szekunder nyirokszerveket kolonizálják.

Következtetés: Az EIVE12 mAb által felismert sejt epiteliális inváziója az embrionális élet során jóval megelőzi a dendritikus/makrofág sejtek follikulusbimbókban történő bevándorlását. Ez az új megfigyelés arra utal, hogy az eddigi elképzeléssel szemben nem a dendritikus prekursor sejtek és a hám dendro-epiteliális kölcsönhatása, hanem egy új sejtípus, az EIVE12+ „limfoid follikulusbimbó indukáló” sejtek inváziója indítja el a follikulogenezist.

## Summary

The avian bursa of Fabricius (BF) is a primary lymphoid organ, critical to normal B-lymphocyte development. During embryogenesis the epithelial anlage of the BF emerges as a diverticulum of the cloaca surrounded by undifferentiated mesenchyme. While it is believed that CD45<sup>+</sup> hematopoietic stem cells colonize the epithelial-mesenchymal primordium that would provide a selective microenvironment for B cell precursor expansion, it is more likely that separate B-cell, macrophage and dendritic cell precursors colonize the mesenchyme, and some precursors migrate to the surface epithelium and initiate lymphoid follicle bud formation.

The goal of this project is to characterize the developmental mechanisms of lymphoid follicle formation using a large panel of monoclonal antibodies (mAbs) specific for leukocytes (CD45), B cells (chB6, EIVE12), macrophages (TIM4) and bursal dendritic cells (CSF1R). The staining of embryonic BF by these mAbs helps to distinguish between three different lineages of hematopoietic cells. CD45<sup>+</sup>/EIVE12<sup>+</sup> cells were first observed in the BF rudiment and many of them enter the surface epithelium to induce follicle bud formation. This will be colonized by the second cell type that belong to the CSF1R<sup>+</sup>/TIM4<sup>+</sup> population, followed by chB6<sup>+</sup> B cell precursors.

In conclusion, we could determine three different types of precursors which colonize the embryonic BF, indicating that there is a pre-bursal segregation between these blood-borne cell lineages. Using chick-duck chimeras, we demonstrate that the first cell types which enter the bursal epithelium are not the dendritic/macrophages or B cell precursors, but are a transient lymphoid bud inducer cell population whose primary role is to induce follicle bud formation.

## Hivatkozások

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

Arakawa H., és Buerstedde J. M. (2004): **Immunoglobulin Gene Conversion: Insights from Bursal B Cells and the DT40 Cell Line.** *Developmental Dynamics*. 229, 3.: 458–464.

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

Balic A., Garcia-Morales C., Vervelde L., Gilhooley H., Sherman A., Garceau V., Gutowska M. W., Burt D. W., Kaiser P., Hume D. A. és Sang H. M. (2014): **Visualisation of chicken macrophages using transgenic reporter genes: Insights into the development of the avian macrophage lineage.** *Development (Cambridge)*. 141, 16.: 3255–3265.

Bar-Ephraïm Y. E., és Mebius R. E. (2016): **Innate lymphoid cells in secondary lymphoid organs.** *Immunological Reviews*. 271, 1.: 185–199.

Reynaud C., Bertocci B., Dahan A. és Weill J.C. (1994): **Formation of the Chicken B-Cell Repertoire: Ontogenesis, Regulation of Ig Gene Rearrangement, and Diversification by Gene Conversion.** *Advances in Immunology*. Editor: Dixon F. J. Academic Press. 57: 353–378.

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

Cooper M. D. (2015): **The early history of B cells.** *Nature Reviews Immunology*. 15, 3.: 191–197.

Davani D., Pancer Z. és Ratcliffe M. J. H. (2014): **Ligation of Surface Ig by Gut-Derived Antigen Positively Selects Chicken Bursal and Peripheral B Cells.** *The Journal of Immunology*. 192, 7.: 3218–3227.

Davison F. (2013): **The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features.** *Avian Immunology: Second Edition*. Editors: Schat K. A., Kaspers B., Kaiser P., Academic Press. 1–9.

Felföldi B., Pharr G. T., Bodi I., Olah I., Alugubelly N., Nuthalapat N. és Fejszak N. (2015): **Monoclonal Antibody EIV-E12 Recognizes a Glycoprotein Antigen, Which Differs from the B-Cell-Specific chB6 (Bu-1) Antigen.** *International Journal of Poultry Science*. 14, 8.: 479–484.

Fellah J. S., Jaffredo T., Nagy N. és Dunon D. (2013): **Development of the Avian Immune System.** *Avian Immunology: Second Edition*. Editors: Schat K. A., Kaspers B., Kaiser P., Academic Press. 45–63.

Glick B. (1994): **The bursa of Fabricius: the evolution of a discovery..** *Poultry science*. 73, 7.: 979–983.

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

Hoorweg K., és Cupedo T. (2008): **Development of human lymph nodes and Peyer's patches.** *Seminars in Immunology*. 20, 3.: 164–170.

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

Houssaint E., Diez E. és Pink J. R. L. (1987): **Ontogeny and tissue distribution of the chicken Bu-1a antigen.** *Immunology*. 62, 3.: 463–46370.

Jaffredo T., Nottingham W., Liddiard K., Bollerot K., Pouget C. és De Bruijn M. (2005):



**From hemangioblast to hematopoietic stem cell: An endothelial connection?** *Experimental Hematology*. 33, 9.

Jaffredo T., és Yvernogeu L. (2014): **How the avian model has pioneered the field of hematopoietic development.** *Experimental Hematology*. 42, 8.: 661–668.

Kaiser P., Poh T. Y., Rothwell L., Avery S., Balu S., Pathania U.S., Hughes S., Goodchild M., Morrell S., Watson M., Bumstead N., Kaufman J. és Young J. R. (2005): **A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines.** *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 25, 8.: 467–484.

Kothlow S., Mannes N. K., Schaerer B., Rebeski D. E., Kaspers B. és Schultz U. (2005): **Characterization of duck leucocytes by monoclonal antibodies.** *Developmental and Comparative Immunology*. 29, 8.: 733–748.

Laparidou M., Schlickerrieder A., Thoma T., Lengyel K. és Schusser B. (2020): **Blocking of the CXCR4-CXCL12 Interaction Inhibits the Migration of Chicken B Cells Into the Bursa of Fabricius.** *Frontiers in Immunology*. 10, 1–10.

Li S., Bai S., Qin X., Zhang J., Irwin D. M., Zhang S. és Wang Z. (2019): **Comparison of whole embryonic development in the duck (*Anas platyrhynchos*) and goose (*Anser cygnoides*) with the chicken (*Gallus gallus*).** *Poultry Science*. 98, 8.: 3278–3291.

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.

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.

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

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

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

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

Nagy N., és Goldstein A. M. (2006): **Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system.** *Developmental Biology*. 293, 1.: 203–217.

Nagy N., Magyar A., Dávid Cs., Gumati M. K. és Oláh Imre (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., és Oláh I. (2007): **Pyloric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken.** *Journal of Anatomy*. 211, 3.: 407–411.

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., Glick B. és Taylor R. L. (1984): **Meckel's diverticulum. II. A novel lymphoepithelial organ in the chicken.** *The Anatomical Record*. 208, 2.: 253–263.

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., Nagy N., Magyar A. és Palya V. (2003): **Esophageal tonsil: A novel gut-associated lymphoid organ.** *Poultry Science*. 82, 5.: 767–770.

Olah I., Medgyes J. és Glick B. (1988): **Origin of aortic cell clusters in the chicken embryo.** *The Anatomical Record.* 222, 1.: 60–68.

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

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

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

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

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

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

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

Scandella E., Bolinger B., Lattmann E., Miller S., Favre S., Littman D. R., Finke D., Luther S. A., Junt T. és Ludwig B. (2008): **Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone.** *Nature Immunology.* 9, 6.: 667–675.

Sharma J. M., Kim I. J., Rautenschlein S. és Yeh H. Y. (2000): **Infectious bursal disease virus of chickens: Pathogenesis and immunosuppression.** *Developmental and Comparative Immunology.* 24, 2–3.: 223–235.

Silva-Sanchez A., és Randall T. D. (2019): **Anatomical uniqueness of the mucosal immune system (GALT, NALT, iBALT) for the induction and regulation of mucosal immunity and tolerance.** *Mucosal Vaccines: Innovation for Preventing Infectious Diseases.* 21-54.

Simic M., Manosalva I., Spinelli L., Gentek R., Shayan R. R., Siret C., Girard-Madoux M., Wang S., de Fabritus L., Verschoor J., Kerdiles Y. M., Bajenoff M., Stumm R., Golub R. és van de Pavert S. A. (2020): **Distinct Waves from the Hemogenic Endothelium Give Rise to Layered Lymphoid Tissue Inducer Cell Ontogeny.** *Cell Reports.* 32, 6.: 108004.

Tonegawa S. (1983): **Somatic generation of antibody diversity.** *Nature.* 302, 5909.: 575–581.

Valinsky J. E., Reich E. és Le Douarin N. M. (1981): **Plasminogen activator in the bursa of Fabricius: Correlations with morphogenetic remodeling and cell migrations.** *Cell.* 25, 2.: 471–476.

Varadé J., Magadán S. és González-Fernández Á. (2020): **Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges.** *Cellular and Molecular Immunology.* 18, 805–828.

Warner, N. Szenberg, A., és Burnet F. (1965): **The Immunological Role of Different Lymphoid Organs in the Chicken. Iv..** *The Australian journal of experimental biology and medical science.* 43. 439–450.

Yvernogeu L., és Robin C. (2017): **Restricted intra-embryonic origin of bona fide hematopoietic stem cells in the chicken.** *Development (Cambridge).* 144, 13.: 2352–2363.

## Köszönetnyilvánítás

Köszöntettel tartozom témavezetőmnek Dr. Nagy Nándornak a Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, Óssejt és Kísérletes Embriológia laboratórium vezetőjének, aki szakértemével és hasznos tanácsaival kitartóan támogatott és lehetővé tette szakdolgozatom elkészítését.

Köszönettel tartozom Dr. Erdei Annának, az Eötvös Loránd Tudományegyetem egyetemi tanárának segítőkész támogatásáért, illetve a dolgozatom alapos és kritikus átnézéséért.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Oláh Imrének, a Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet egyetemi tanárának, aki sok bölcs és építő jellegű tanáccsal látott el.

Továbbá köszönöm az Óssejt és Kísérletes Embriológia Laboratórium munkatársainak, akik hozzáértésükkel, tanácsaikkal, valamint barátságukkal végig támogattak: Dr. Dóra Dávid, Halasy Viktória, Jancsovics Dalma, Kovács Tamás, Pecsénye-Fejszák Nóra, Pethő Csongor. Külön szeretném megköszönni Soós Ádámnak a közös munkát, akinek segítségével az egész kísérletsorozat idején nagyon értékesnek bizonyult.