

# **Egy új madár epithelium specifikus monoklonális ellenanyag karakterizálása**

Készítette:

*LACKÓ ERZSÉBET*

az Eötvös Loránd Tudományegyetem V. éves biológus hallgatója

Témavezetők:

Dr. Nagy Nándor, Prof. Dr. Oláh Imre  
Semmelweis Egyetem,  
Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet

Konzulens:

Dr. László Lajos  
Eötvös Loránd Tudományegyetem,  
Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

2007. Budapest

# TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés	4
Irodalmi áttekintés	5
<b>1. A bursa Fabricii jelentősége</b>	5
<b>2. A bursa Fabricii fejlődése és szövettani szerkezete</b>	5
2.1. A bursa fejlődése	5
2.2. A bursa follikulusok szerkezete	8
Célkitűzések	12
Anyagok és módszerek	13
<b>1. Kísérleti állatok</b>	13
<b>2. A minták szövettani feldolgoása</b>	13
2.1. Májba ágyazott fagyasztott blokk készítése	13
2.2. Zselatin-szacharózos fagyasztott blokk készítése	13
2.3. Metszetek készítése	14
<b>3. Immunhisztokémiai festések</b>	14
3.1. Immunhisztokémia	14
3.2. Egyszeres immunfluoreszcens festés	15
3.3. Kettős immunfluoreszcens festés	16
3.4. Felhasznált primer ellenanyagok és oldatok	16
<b>4. Epidermális sejtek tenyésztése</b>	18
<b>5. Gélelektroforézis és Western-blot</b>	18
5.1. Minta	18
5.2. Gélek összemérése	19
5.3. SDS gélelektroforézis, futtatás	20
5.4. Blottolás nitrocellulóz membránra	20
5.5. Festés	21
<b>6. Fényképezés és képfeldolgozás</b>	21

---

Eredmények	22
1. A 2H4-pozitív sejtek szöveti eloszlásának jellemzése a felnőtt madár szövetekben	22
2. A 2H4-pozitív sejtek megjelenésének vizsgálata az embrionális fejlődés során	26
3. A 2H4 pozitív fehérje sejtbeli lokalizációjának meghatározása	28
4. A 2H4 pozitív fehérje molekulatömegének meghatározása	30
Eredmények megvitatása és következtetések	31
Köszönetnyilvánítás	34
Irodalomjegyzék	35

## **Bevezetés**

*Napjainkban a monoklonális ellenanyagokat széles körben alkalmazzák mind az alapkutató, mind a klinikai diagnosztika területein.*

*Ha a monoklonális ellenanyag egy adott sejttípusra specifikus molekulát ismer fel, kiváló eszközt jelent a kérdéses sejttípus eredetének, differenciálódásának illetve egy szöveten belüli előfordulásának tanulmányozására.*

*A monoklonális ellenanyagok előállítására hybridómák klónozásával készül. A hybridóma-módszer során mieloma-sejteket fuzionáltatunk immunizált egérből származó lépsejtekkel. A sejtfúzió olyan sejteket, hybridómákat eredményez, amelyek termelik az ismert antigénre specifikus ellenanyagot, és rendelkeznek a tumorsejtekre jellemző halhatatlansággal is. Az ellenanyagot termelő hybridómákat többszöri klónozási eljárásnak vetjük alá, és az így kitisztított klónok fogják termelni az immunizálás során használt sejteket vagy molekulákat specifikusan felismerő ellenanyagokat. Ezután a klón által termelt monoklonális ellenanyagot karakterizálni kell, vagyis meg kell határozni az általa felismert sejt típusát, szöveti eloszlását, fajspecifitását, és az általa felismert antigén sejtbeli lokalizációját és biokémiai tulajdonságait.*

*Laboratóriumunkban nagyszámú, a nyirokszervek, különösképpen a bursa Fabricii stromális sejtjeire specifikus, egér monoklonális ellenanyag készült. Ezek alkalmazása lehetőséget nyújt a nyirokszervek stromális sejtjeinek tanulmányozására, embrionális fejlődésük nyomonkövetésére.*

*A lymphomyeloid szervek stromális elemeinek vizsgálata közelebb visz a véreredetű őssejtek differenciálódását szabályozó mikrokörnyezet megismeréséhez, melynek elméleti és gyakorlati jelentősége egyaránt van.*

## **Irodalmi áttekintés**

### **1. A bursa Fabricii jelentősége**

A bursa Fabricii Hieronymus Fabricius ab Aquapendente írta le először 1621-ben, mint a csirkék végbeléhez kapcsolódó tasakot. Úgy vélte, hogy a bursa a spermiumok tárolására szolgál és ez az elképzelés közel négyszáz évig fennmaradt. Glick és munkatársai 1956-ban írták le, hogy sebészi bursectomiát (bursaeltávolítás) követően az antigénspecifikus ellenanyagtermelés károsodik (Glick, 1983). Így jöttek rá, hogy az ellenanyag közvetítette immunválaszt a bursa Fabricii eredetű B-sejtek végzik. Ezután kezdték el meghatározni emlősökben az úgynevezett bursa-equivalens szerveket, ide tartozik a juh Peyer plakk, a nyúl appendix vagy emberben és a többi emlősben a csontvelő (Reynaud et al. 1991, Weinstein et al. 1994). A bursa az immunológiai kutatások fontos részévé vált, hiszen a B-sejtekről alkotott mai képünk részben a madarak bursáján elvégzett kutatások nyomán alakult ki.

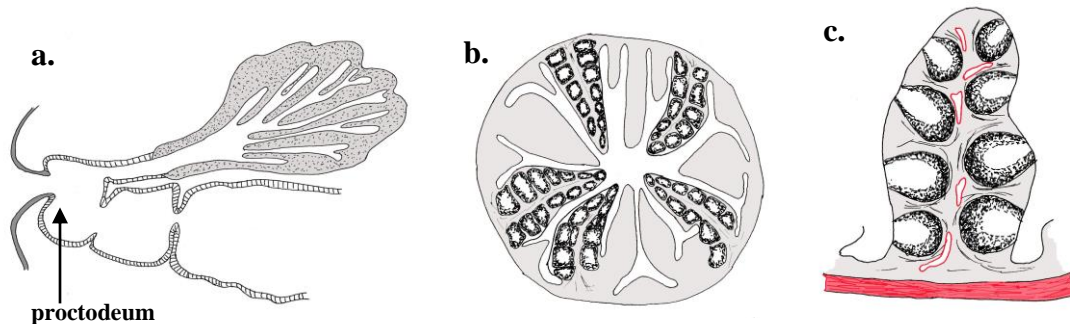
A bursa Fabricii tehát a madarak primer nyirokszerve, benne zajlik a B-lymphocyták differenciálódása és érése, itt tanulják meg a saját struktúrák felismerését. Az érett lymphocyták innen kerülnek a keringésbe, majd a szekunder nyirokszervekbe, ahol képesek felismerni a szervezetbe kerülő idegen antigéneket.

### **1. A bursa Fabricii fejlődése és szövettani szerkezete**

#### **2.1. A bursa fejlődése**

A bursa a madarak cloacájának proctodeum részéhez csatlakozik (1a. ábra). Epithelialis telepe az embrionális élet 5. napján jelenik meg. Ez a telep az ectodermális proctodeum és az entodermális urodeum határán, hámcsap formájában, dorsalis irányban a mesenchymába kezd belenőni. A hámcsap belsejében a hámsejtek apoptózissal elpusztulnak, helyükön vakuolumok képződnek, majd ezek összenyílásával üreg képződik (Oláh et al. 1986; Miller and Briglin, 1996). A 9. naptól az üreget hosszanti

redők tagolják, melyeket a mesenchyma sejtek proliferációja hoz létre, ezért a bursa keresztmetszete az üregbe domborodó redők miatt csillag alakú (1. b ábra).



**1. ábra:** *Bursa Fabricii* sémás szövettani szerkezete. **a.)** a bursa median-sagittális metszete, összeköttetésben a cloaca proctodeumával, **b.)** a bursa keresztmetszete a lumenbe benyúló redőkkel, **c.)** a bursa redőiben elhelyezkedő folliculusok.

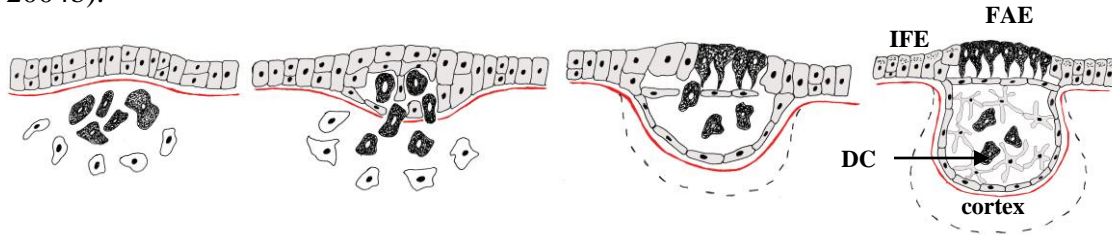
A redőkben számos, B-lymphocytákkal feltöltött, szorosan egymás mellett elhelyezkedő folliculus jelenik meg (1. c ábra). A folliculusok a bursa szerkezeti és funkcionális alapegységei, kéreg és velőállományból állnak.

A 9. és 10. embrionális napon a hám alatti mesenchymában, toluidin kézzel festett félvékony metszeteken, u.n. sötét sejtek jelennek meg. Ezek orsó alakúak, erősen basophylen festődnek, a hám alá vándorolnak, ott csoportosulnak, míg a körülöttük levő világos, mesenchymális sejtek végig egyenletes eloszlást mutatnak (Oláh et al. 1986, Lupetti et al. 1986, 1990). A sötét sejtek a hámmal kontaktusba kerülnek, átlépik az alaphártyát, ezeken a helyeken a hámsejtek proliferálni kezdenek, bimbószerűen a mesenchymába nőnek, maguk előtt tolva az alaphártyát és ezzel kezdetét veszi a folliculusok kialakulása. A folliculusok indukcióját elindító sötét sejtek hemopoetikus eredetét laboratóriumunk bizonyította csirke-fürj kiméra módszerrel (Nagy et al., 2004).

A folliculusok tehát csak azokon a helyeken képződnek, ahol a sötét sejtek a hámba vándorolnak. Ezek a folliculus-bimbók a későbbi bursa folliculusok velőállományának kezdeményét jelentik, amely befogadóképpé válik a B-sejt progenitorok számára.

A sötét sejtekre felszíni CD45 pozitivitás jellemző, citoplazmájukban vimentin intermediér filamentumot, NIC2 és 74.3 antigéneket fejeznek ki (Oláh et al. 1992., Nagy et al., 2004a, 2004b). A folliculusokat indukáló sötét sejtekből differenciálódnak a

CD45+/MHCII+/74.3+/NIC2+ bursai szekréciós dendritikus sejtek (Nagy et al., 2004a, 2004b).



**2. ábra:** *A bursa Fabricii folliculus embrionális és posztembrionális fejlődése. A sötét sejtek elhelyezkedése, hámba vándorlása és differenciálódásuk. (IFE: interfollikuláris epithelium, FAE: folliculus asszociált epithelium, DC: dendritikus sejtek)*

A fejlődő bursatelepet, annak vaszkularizációja után hemopoetikus eredetű sejtek népesítik be (Le Dourain et al. 1975). A sötét sejteket követően granulocytá prekursorok (Quesda et al. 1985), majd a 10. embrionális naptól kezdve a B-lymphocytá progenitorok kolonizálják a bursa telepét (Houssaint et al. 1991, 1987). T-sejtek kis számban fordulnak elő embrionális és felnőtt bursában.

A felszíni Bu1b pozitív B-lymphocytá progenitorok belépve a folliculus-bimbóba intenzív osztódásba kezdenek, emiatt a hámsejtek fokozatosan nyúlványossá, csillag alakúvá válnak, retikulumsejteké differenciálódnak (Hoshi et al. 1987, Sanchez-Refusa et al. 1996). A progenitorok osztódásával párhuzamosan az immunglobulin gének konverziója is megtörténik, így kialakul az immunglobulin molekulák sokfélesége (Masteller et al. 1994, Otsubo et al. 2001). Madarakban a génkonverzió csak a bursa folliculusaiban megy végbe, a stromális sejtek mikro környezetében, melyet a szekréciós dendritikus sejtek és a hámretikulumsejtek alkotnak.

A génkonverzió áttesett B-sejtek a kikelés előtt néhány nappal kilépnek a velőállományból, a mesenchymasejtek közé telepednek, kialakítva a kéregállományt. A B-sejtek a kéregállományból a vér- és nyirokkeringésbe jutva a szekunder nyirokszervekben telepednek meg, ilyen a lép (Oláh et al. 1985), coecalis tonsilla (Oláh and Glick, 1979), Harder mirigy (Kittner and Oláh, 1980), corpus pineale (Cogburn and Glick, 1983), Meckel divertikulum (Oláh et al. 1984, Jeurissen et al. 1989), oesophagus tonsilla (Oláh et al. 2003, Nagy et al. 2005), pylorus tonsilla (Nagy and Oláh, in press 2007).

A kéregállomány, ellentétben a velőállomány hámretikulumával, mezodermális eredetű sejtek hálózatából áll. A sötét sejtek hámba vándorlásának területén alakul ki a follikulum asszociált epithelium (FAE), a 12. és 15. nap között (Lupetti and Dolfi 1982, 1990, Oláh et al. 1986, Nagy et al. 2001).

Az eredeti hámréteg kiszorulva helyéről a follikulumok közé kerül, ezek lesznek az interfollikuláris sejtek (IFE).

## **2.2. A bursa follikulumok szerkezete**

A follikulumok a bursa szerkezeti és funkcionális alapegységei. A bursa redői, melyeket nyirokszövet tölt ki, kötőszöveti sövények által follikulumokra tagoltak.

A bursa follikulumokban található sejtek nagy része B-lymphocyta. Ezek nagy heterokromatikus sejtmaggal, a mag körüli vékony citoplazmával rendelkező kerek sejtek. Itt zajlik az immunglobulin gének génkonverziója, aminek következtében kialakul a B-sejtek nagy változatossága (Ig-repertoár).

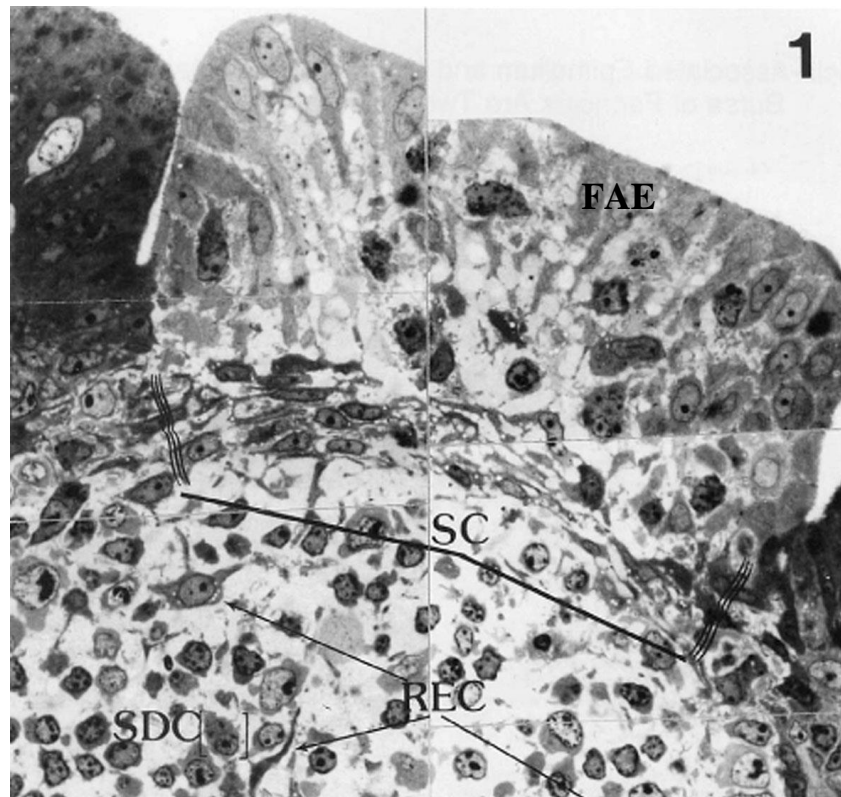
A velőállomány sejtjei közé tartoznak még a hemopoetikus eredetű (Nagy et al., 2004) szekréciós dendritikus sejtek (secretory dendritic cell, SDC, 1978-ban Oláh és Glick írta le először). Ezek hosszan elnyúlt, két asszimetrikus nyúlvánnyal rendelkező sejtek. Az egyik nyúlványban fejlett durva felszínű endoplazmatikus retikulum, Golgi apparátus és nagy számú sötét, elektronsűrű anyagot tartalmazó granulum található, ami a SDC-k szekréciós képességére utal, míg a másik nyúlvány granulum mentes, a citoplazmát intermediér filamentumok töltik ki. A filamentumokat vimentin képezi, hasonlóan a lép, a coecalis tonsilla csírcentrumainak follikuláris dendritikus sejtjeihez, vagy a bőr Langerhans sejtjeihez. Vimentin pozitívitásuk miatt jól elkülöníthetők a vimentin negatív B-sejtektől és a cytokeratint tartalmazó hámsejtektől (Oláh and Glick, 1992, Oláh et al. 1992, Viamontes et al. 1989).

A bursa redők hámsejtekkel borított felszínének 90%-át interfollikuláris hám fedi (IFE), ez basális membránon ülő hengerhámsejtekből, és differenciálatlan hámsejtekből áll. 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, valószínűleg a hengerhámsejtek pótlásában van szerepük (Betti, 1989).





follikulusbimbó képződésekor a redő felszíni hengerhámsejtjeiből differenciálódik. Csillag alakú, nyúlványos sejtek, melyek egymással desmosomák segítségével kapcsolódnak össze. A velóállomány szélén a sejtek nem nyúlványosak, ellaposodottak, árkádot képeznek, ezek alkotják a kéreg- és velóállományt elválasztó, ún. kortikomedulláris hámsejt réteget. Bazális membránjuk az IFE alaphártyájának közvetlen folytatása. Ez a bazális membrán választja el egymástól a kéreg és velóállományt, és csak aktív sejtáramlásra ad lehetőséget.



**4. ábra:** Bursa folliculus félvékony metszetből készült képe. A kép tetején a folliculus asszociált epithelium (FAE), alatta a FAE-támasztó sejtek és a bursa velóállományában elhelyezkedő dendritikus sejtek és hámretikulum sejtek láthatóak. (Oláh and Glick, 1992.). FAE: folliculus asszociált epithelium, SC: FAE támasztó sejtek, SDC: szekretoros dendritikus sejtek, REC: hámretikulum sejtek.

A folliculusok kéregállománya csak kikelés után alakul ki, alapvázát a mesenchymából származó retikulum sejtek (desmin+/vimentin+) képezik (Oláh and Glick, 1995). Ide vándorolnak ki a velóállományból az érett B-sejtek, ezen kívül

makrofágokat, plazmasejteket, granulocytákat is tartalmaz. A kéreg- és velóállomány határa gazdagon kapillarizált, nagyszámú vér- és nyirokérkapilláris található a bazális membrán kéreg felőli oldalán, melyek szerepe az érett B-sejtek elszállításában van, innen jutnak tovább a perifériás nyirokszervekbe (Tar et al. 1986). A bursa Fabricii az ivarérettség elérése előtt sorvadni kezd és 6 hónapos korra teljesen eltűnik.

A bursa embrionális fejlődése során a velóállományt a felszíni hám (FAE) és a bazális membrán határolja el a külvilágtól, illetve a kéregállománytól, egy izolált mikrokörnyezetet hozva létre (Otsubo et al. 2001, Morimura et al. 2001, Wilson and Boyd, 1990). Ez a mikrokörnyezet felelős a B-sejt repertoár kialakulásáért. Létrehozásában a dendritikus és hámretikulum sejteknek van jelentős szerepük. Befogadó képessé teszik a follikulusokat a B-lymphocytá progeneratorok számára és ők felelősek a B-sejtek fejlődését és differenciálódását irányító faktorok termeléséért.

A kikelés előtti néhány naptól kezdve a FAE sejtek képessé válnak a bursa lumenéből az antigén felvételre, melyet a follikulusok velóállománya felé transzportálnak. Az így bekerült antigének felelősek a lymphocyták további differenciálódásáért, klonális expanziójáért, ezáltal a FAE sejtjei is részt vesznek a bursális mikrokörnyezet kialakításában.

A bursai mikrokörnyezet kialakításáért felelős sejtek közül a velóállomány hámretikulumsejtek ontogeneziséről, differenciálódásáról és funkciójáról nagyon kevés információval rendelkezünk, holott fontos szerepet játszhatnak a B-sejtek érésében.

## Célkitűzések

A bursa Fabricii fejlődésére és immunológiájára vonatkozó ismereteink nagyrészt a házityúkon (*Gallus domesticus*) elvégzett kísérletekből származnak. Nagyon sok madár ellenes monoklonális ellenanyag van kereskedelmi forgalomban, azonban ezek között nincs olyan marker, amely specifikusan a bursa Fabricii folliculusok velőállományának hámretikulumát jelölné.

Munkánk során a laboratóriumunkban készült bursa Fabricii hámsejtjeire specifikus, egér monoklonális, IgG3 izotípusú, 2H4 elnevezésű ellenanyag immuncitokémiai karakterizálását végeztük. Célkitűzéseink a következők voltak:

1. A 2H4-pozitív sejtek szöveti eloszlásának jellemzése a felnőtt madár szövetekben
2. A 2H4-pozitív sejtek megjelenésének vizsgálata az embrionális fejlődés során
3. A 2H4 pozitív fehérje sejtbeli lokalizációjának meghatározása
4. A 2H4 pozitív fehérje molekulatömegének meghatározása

## **Anyagok és módszerek**

### **1. Kísérleti állatok:**

A vizsgálatokhoz SPF White Leghorn-, gyöngytyúk-, fűj- és pulyka tojásokat használtunk. A tojásokat saját keltetőinkben inkubáltuk, 37,7°C-on, 60 %-os páratartalom mellett, forgatórácon. Immuncitokémiai festéseket végeztünk hörcsög, patkány, béka, humán (tonsilla) szöveteken is. A kísérletek során különböző korú embriókat és felnőtt állatokat használtunk fel. Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával történtek (engedélyszám: 779-000-2005).

### **2. A minták szövettani feldolgoása**

A kísérletek során embrionális és felnőtt állatok nyirokszerveit (bursa, thymus, oesophagus tonsilla), bőrét, tüdejét, veséjét, belét és farokbimbóját használtuk fel. A kivett szervekből immuncitokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokra májba ágyazott-, vagy zselatinos fagyasztott blokkot készítettünk.

#### **2.1. Májba ágyazott fagyasztott blokk készítése**

A kivett szerveket foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS, pH= 7,2) tartottuk a blokk elkészítéséig. A beágyazás során egy májszeletet 1,5x1,5 cm-es kartonpapírra helyeztünk, erre tettük a szerveket, majd vékony májdarabokkal teljesen befedtük. Az így előkészített mintát folyékony nitrogén gőzében -110°C-on lefagyasztottuk. A későbbi felhasználásig a blokkokat -80°C-on tároltuk.

#### **2.2. Zselatin-szacharózos fagyasztott blokk készítése**

A szerveket 1 órán keresztül fixáltuk 4 %-os paraformaldehidben, majd PBS-ben 3x5 percig mostuk. 15 %-os szacharóz PBS oldatában 1 éjszakán át inkubáltuk (hűtőben, 4°C-on). Ezt követően a cukros oldatot zselatinos oldatra cseréltük, 37°C-on 1 órára

15 %-os szacharózt (Reanal puris, M: 342,30) és 7,5 % zselatint (Fluka, kat. szám: 04055) tartalmazó PBS-be helyeztük. Az így impregnált szerveket zselatin ággal előkészített tálkába raktuk. Hagytuk 10 percig állni, hogy a szervek a zselatinhoz tapadjanak, majd meleg zselatinnal befedtük őket. 4°C-on szilárdulni hagytuk, majd körbevágással kialakítottuk a kívánt méretű blokkot. Az így nyert zselatin blokkokat Shandon Cryomatrix-al (Anatomical Pathology Ind., 6769006) kartonpapírra rögzítettük. A kapott blokkokat folyékony nitrogénben lehűtött, -60°C-os 2-metilbután izopentánban (Fluka, 59075) lefagyasztottuk, majd felhasználásig -80°C-on tároltuk.

### **2.3. Metszetek készítése**

Metszésre Shandon gyártmányú kriótómot használtunk, amely májas blokkok esetében -17°C-ra, zselatinos blokkoknál -24°C munkahőre volt beállítva. A blokkokat metszés előtt a kriosztátba helyeztük, hogy átvegyék annak hőmérsékletét. A mintákból 10µm vastag metszeteket készítettünk, melyeket poly-L-lysin-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezre vettük fel. Májas blokkok esetében, miután a metszetek szobahőmérsékleten rászáradtak a lemezre, 4°C-os acetonban fixáltuk azokat 10 percig.

## **3. Immunhisztokémiai festések**

### **3.1. Immunhisztokémia**

A 2H4 felnőtt és embrionális szövetekben való kifejeződését fagyasztott metszeteken, immunhisztokémiával a következő protokoll szerint végeztük el.

A metszeteket rehidráltuk PBS-ben 10 percig. Ezt követően a metszeteket lefedtük a primer ellenanyaggal (1. táblázat), ami vagy egy monoklonális ellenanyagot tartalmazó, hígítatlan sejtenyészeti felülúszója, vagy egy előzetesen betitrált hígítású ellenanyagoldat volt (a hígítást 1 %-os BSA-t és azidot tartalmazó PBS-ben -PBS-BSA- végeztük), majd a metszeteken 45 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, nedveskamrában. Ezt mosás követte PBS-ben (3x5 perc).

Ezután PBS-BSA-ban kihígított biotinilált szekunder ellenanyagot (biotinilált anti-egér IgG, Vector Laboratories, BA-2000) vittünk fel a metszetekre (45 perc inkubálás szobahőmérsékleten, nedveskamrában). Újabb mosás PBS-ben (3x5 perc). Endogén peroxidáz aktivitás blokkolása következett, PBS-ben 0,3%-ra hígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal (Sigma-Aldrich, H1009) 10 percig kezeltük a metszeteket. Mosás PBS-ben (3x5 perc).

Mosás után ABC-komplexet (avidin-biotinilált peroxidáz komplex, Vectastain Elite PK-6100, Vector Laboratories) vittünk a metszetekre. Az oldatot a cég által megadott hígításban készítettük el (1:100 arányban, PBS-ben), PBS-be kimérjük az avidin-, majd a biotinilált peroxidázt tartalmazó oldat megfelelő mennyiségét, alaposan felkevertük, majd fél óra állás után használtuk fel. A metszeteket fél óráig inkubáltuk ABC-komplex-el. Mosás PBS-ben (3x5 perc). A kötődött peroxidáz enzim aktivitását kloronaftollal detektáltuk. A feloldott kloronaftolt (Sigma-Aldrich, C8890) előzetesen kimértük, PBS-be vittük (100 µl CN 100 ml PBS-be), és sötétben mágneskeverőn legalább fél órát kevertettük. Kevertetés után szűrőpapíron leszűrtük és 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t (500 µl) adtunk hozzá, közvetlenül a felhasználás előtt. Ebben az oldatban 30 percig festettük a metszeteket. Mosás PBS-ben (3x5 perc). A metszeteket Aqua-Poly/Mount-al (Polysciences, 18606) fedtük le. 4°C-on sötétben tároltuk.

### **3.2. Egyszeres immunfluoreszcens festés**

Egyszeres immunfluoreszcens jelölés esetén Streptavidin konjugált Alexa-488-at (Invitrogen, A31619) vagy Alexa 594-et (Invitrogen, A31623) alkalmaztunk. Az előzőekben leírt módszer szerint metszeteinkre ráértük a primer és szekunder ellenanyagokat, majd a Streptavidin Alexa Fluor 594-et vagy 488-at, amit PBS-ben hígítottunk. A fluorokrómot 45 percig hagytuk a metszeteiken, ezt 3x5 perc mosás követte PBS-ben.

A sejtmag kimutatására DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, D1306) reagenst használtunk, PBS-ben hígítva 1 µg/ml arányban. Ezt 10 percig hagytuk a metszeteiken, majd 3x5 perc mosás következett PBS-ben, lefedés és tárolás (sötétben, 4°C-on).

### **3.3. Kettős immunfluoreszcens festés**

Az ellenanyag karakterizálása során más fehérjékkel való kollokizációjának meghatározására kettős immunfluoreszcens festést használtunk.

A kettős festés során első lépésben ráértük a metszetekre az első primer ellenanyagot (2H4) majd 45 perc inkubálás és mosás (PBS) után ezt az izotípus specifikus szekunder ellenanyag (biotinilált anti-egér IgG3) követte. Szintén 45 perc inkubálódás és 3x5 perc mosás (PBS) után ráértük a Streptavidin Alexa 488-at (zöld színnel fog világítani), 30 percig hagytuk rajta (1:200-ban hígítottuk PBS-ben), majd mostuk (3x5 perc, PBS-ben).

A metszetre ráértük a második primert (Lu5/cytokeratin). 45 percig inkubálódni hagytuk, majd mostuk 3x5 percig PBS-ben. Ezt követte az anti-egér IgG1-Alexa 594 (BioScience, Molecular Probes, A-21125), ez egy izotípus specifikus szekunder ellenanyag, 1:200-ban hígítottuk PBS-BSA-ban, 45 percig hagytuk a metszeten, majd lemostuk (3x5 perc PBS).

Mindezeket követi a sejtmagfestés DAPI-val 10 percen keresztül, végül 3x5 perc mosás, lefedés és tárolás sötétben 4°C-on.

### **3.4. Felhasznált primer ellenanyagok és oldatok**

*0,1M PBS (pH= 7,2):* 1 liter oldat összetétele: NaCl 8 g, KCl 0,2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,42 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g, desztillált víz.

*Pufferelt 4%-os paraformaldehid, pH= 7,4 (PFA):* 700 ml desztillált vizet bemérünk egy 1000 ml-es lombikba és 60°C-ra felmelegítjük. Hozzáadunk 40 g paraformaldehidet és mágneses keverőre helyezük. A keletkezett csapadékot cseppenként hozzáadott 20%-os (5M-os) NaOH-dal feloldjuk. Az oldatot megsűrjük, majd 250 ml 0,24M PBS-t adunk hozzá. Még mindig mágneskeverőn beállítjuk a pH-t, majd az oldatot átöntve 1000 ml-es mérőhengerbe, térfogatát desztillált vízzel kiegészítjük 1000 ml-re.



1%-os PBS-BSA: 1 g BSA-t (BovineAlbumin, Sigma A9647), 100 ml PBS-ben feloldunk. Szűrés után 0,1 %-ban  $\text{NaN}_3$ -at adunk hozzá.

Chloronaphthol készítése: törzsoldat készítéséhez 500 mg 4-chloro-1-naphtol (Sigma, C8890) oldunk fel 2 ml abszolút ethanolban, majd  $-20^\circ\text{C}$ -on tároljuk. Előhíváskor a törzsoldatból hígítunk, hogy a végtérfogat 25 ml/100ml PBS legyen.

<i>Felismert sejttípus (ellenanyag specifitása)</i>	<i>Ellenanyagok</i>	<i>Forrás</i>
Hámsejtek (páncytokeratin)	<b>Lu-5</b> (egér IgG1)	BMA, Biomedicals AG Augst, Switzerland
Hámsejtek és neuronok	<b>Ben</b>	DSHB, Iowa, IA
Hámsejtek	<b>E-cadherin</b>	SIGMA
Hámsejtek és thrombocyták	<b>K1</b>	Gift from H. Lillehoj, FDA Washington DC
Hámsejtek	<b>5E2</b>	saját
Hámsejtek	<b>9E2</b>	saját
Hámsejtek	<b>2H4</b>	saját
B-sejt és makrofág alpopuláció ( <b>Bu-1b</b> )	5-11G2(egér IgG1)	Southern Biotechnology
B-sejt és plazmasejtek	<b>EIVE12</b> (egér IgG1)	Dr. Todd Pharr szívességéből, Mississippi, USA (Pharr és mtsai 1995)
Folikuláris dendritikus sejtek	CVI-ChNL- <b>74.3</b> (egér IgG1)	CEDI-Diagnostics, Lelystad, Netherlands
Makrofágok	CVI-ChNL- <b>74.2</b> (egér IgG1)	CEDI-Diagnostics
Hemopoetikus sejtek ( <b>CD45</b> )	HIS-C7(egér IgG2a)	Cedi

**1. táblázat:** Felhasznált primer ellenanyagok

## 4. Epidermális sejtek tenyésztése

Az ellenanyag által jelölt fehérje sejbeli lokalizációjának, szerkezetének vizsgálatára, valamint molekulatömegének meghatározására epidermális sejttenyészetből származó sejteket használtunk fel.

Az izolált bőrt (felnőtt csirke szárny alatti tollmentes területéről) vékony, kb. 0.2x2 cm nagyságú csíkokra vágtuk és komplett RPMI médiumban (Sigma, R0883) inkubáltuk (összetétele: 10 % FBS, 2 mM L-glutamin, MEM nem-esszenciális aminosav oldat, MEM vitaminok, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10 mM Hepes, 1 mM nátrium-piruvát, 0,05 mM 2-ME) 1 órát 37 °C-on. A médium 2 mg/ml-es koncentrációban diszpázt (Roche, 165859) tartalmazott.

Inkubációt követően az epidermiszt elválasztottuk a dermisztől (csak az epidermiszre volt szükségünk), majd a PBS-es mosást követően a bőrnyúzatokat 37 °C-on további 30 perces tripszines emésztésnek vetettük alá (0,25 %-os, PBS-EDTA-ban hígítottuk). A sejtek összecsapódását DnázI (Roche, 1284932) alkalmazásával védtük ki (0,2 mg/ml). Ezt csak az EDTA után adhatjuk hozzá, mert az EDTA gátolja a DnázI-et.

Az így kapott sejteket – PBS-ben történő mosás után - komplett RPMI médiumba vettük fel, majd tenyészetbe helyeztük őket (24 lyukú plétbe, minden lyukban kis üveg fedőlemez volt, erre nőttek rá a sejtek). 4-5 napi tenyésztés után egy részüket lefixáltuk acetonnal, és immunfluoreszcensen megfestettük.

## 5. Gélelektroforézis és Western-blot

### 5.1. Minta

Az antigén molekulatömegének meghatározására epidermális sejttenyészetet használtunk.

A sejttenyészetből származó sejteket RIPA pufferben (Sigma, 046K6055) lizáltuk, amelybe protáz gátló tablettát (Roche, 11575300) adtunk, hogy a fehérjék ne bontódjanak le. A RIPA pufferben detergens van, ami kioldja a lipideket, így egy fehérjelizátumot

kaptunk, a reakció 1 órán át ment olvadó jégen. A lizátumot lecentrifugáltuk és a felülúszót használtuk tovább.

Fele-fele arányban mértük össze a mintát (felülúszó) és a puffert (redukáló vagy nem redukáló oldatban, a redukáló merkaptoethanolt tartalmaz, ami a fehérjék közötti diszulfid hidakat bontja). 4 percig főztük kilyukasztott tetejű Eppendorfban. Ezután a mintákat a géltre rétegeztük.

## 5.2. Gélek összemérése

A gélöntés BioRad gélöntővel történt.

### **Alsó gél:**

A géleket sorban összekevertük (lásd. alsó és felső gél). A vonal felettieket mértük össze előbb: légtelenítettük, amíg már nem habzott, csak ezek után adtuk hozzá a maradék két komponensre ügyelve, hogy buborékok ne kerüljenek bele, enyhén összekevertük (körkörös mozdulatokkal). Azért kellett az utolsó két komponens előtt légteleníteni, mert a TEMED beindítja a polimerizálódást, az APS hatását segíti elő, az APS-is a poliakrilamid térhálósodását idézi elő.

A gélt pipettával beletöltöttük a formába, vonalig, utána vizes amilalkoholt rétegeztünk (50 ml amil-alkohol + 5 ml UTV) a tetejére fecskendővel, kb. 1/2-3/4 ml-t, ez elsimította a gél tetejét. 45 perc polimerizálódás után az amilalkoholt kimostuk, 3x ultra tiszta vízzel.

<b>ALSÓ GÉL</b>	<b>10%</b>
ultratiszta víz (UTV)	5,85 ml
1,5M Tris-HCL, pH: 8,8	3 ml
10 % (W/V) SDS-oldat	120 µl
Akrilamid/Bis oldat	2,97 ml
10 % ammónium perszulfát (APS)	60 µl
TEMED	6 µl

A végtérfogat 12 ml, a 40%-os Akrilamid/Bis –ből mérjük ki

**Felső gél:**

Ugyanúgy mértük össze, mint a fent leírtakban.

A gél beöntése előtt betettük a spacert (fésű) ferdén, a gélét lassan ráöntöttük (buborékmentesen), majd óvatosan benyomtuk a fésűt a helyére. 45 percig hagytuk polimerizálódni.

<b>FELSŐ GÉL</b>	<b>10%</b>
ultratiszta víz (UTV)	6,425 ml
0,5M Tris-HCL, pH: 6,8	2,5 ml
10 % (W/V) SDS-oldat	100 µl
Akrilamid/Bis oldat	0,975 ml
10% ammónium perszulfát (APS)	50 µl
TEMED	10 µl

A végtérfogat 10 ml, a 40%-os Akrilamid/Bis –ből mérjük ki.

**5.3. SDS gélelektroforézis futtatás**

A géleket összeraktuk, beleraktuk a futtató edénybe, az 1. az 1. helyhez, a 2. a 2.-hoz. Feltöltöttük futtató pufferrel: 70 ml törzsoldatot (9 g Trisbase, 43,2 g glycine, 3 g SDS, 600 ml-re desztillált vízzel kiegészítve, pH= 8,3, ez 5x-ös koncentráció) 350 ml-re egészítettük ki desztillált vízzel. A puffert először a két gél közé, a belső kamrába öntöttük (úgy, hogy betakarja a zsebeket, de ne menjen a magasabb üveglap fölé), ezután a külső kamrát is feltöltöttük.

Ezután a mintákat a gélre rétegeztük. Egy zsebbe 15-20 µl-t mérünk Hamilton pipettával (a molekulásúly standardból 5 µl-t).

**Futtatás:**

200 Volt (csökkenő amper), 45 percig.

**5.4. Blottolás nitrocellulóz membránra**

Amikor kész, kivettük a gélét, egy tálkába helyeztük blottoló pufferbe, hagytuk, hogy átitatódjon. Blottoló puffer (jól le kell hűteni): 800 ml desztillált víz, 200 ml metanol, 3,03 g Tris, 14,4 g glycin.

A blottoláshoz, a következőket sorrendben összeraktuk: szűrőszivacs, 2 szűrőpapír, gél, membrán, 2 szűrőpapír, szűrőszivacs. Ezeket mind beáztattuk előre, a membránt száraz kézzel fogva óvatosan benedvesedni hagytuk a blottoló pufferben, a gélt kicsit megmostuk. Ezeket összezártuk, majd a blottoló edénybe helyeztük. A kamrát feltöltöttük a blottoló pufferrel, jégakut is helyeztünk a kamrába, hogy megakadályozzuk a túlmelegedést, és egy keverőbabát, így egyenletes hőmérsékletet biztosítottunk végig.

100 Volt-on, 60 percig, növekvő amperrel (0,1-ről 0,4 mA-re), vagy 30 Volt-on 1 éjszakán át hűtőben blottoltuk. Amikor lejárt, a membránt mostuk, festettük.

A membránt nem zsíros tejben blokkoltuk, hogy megakadályozzuk a nem-specifikus fehérje kölcsönhatásokat a membrán és az antitest fehérjék között, a tejfehérjék a szabad helyekre kötődtek be (15 perc). Újabb mosás (3x 0,05 % PBS-Tween20 – Reanal, 20142).

### **5.5. Festés**

A PBS-Tweenből kivett membránt parafilmre helyeztük, papírvattával leitattuk róla a felesleges folyadékot, és immunhisztokémiát végeztünk el rajta. Rámértük a primer ellenanyagot, 45 perc állás után PBS-Tweenben 3x5 percig mostuk. Ezt követte a szekunder ellenanyag (biotinilált anti-egér IgG), 45 percig hagytuk rajta, amit 3x5 perc mosás követett PBS-Tweenben. Mosás után ABC-komplexet vittünk a membránra amit 30 percig hagytunk rajta, újabb mosás (3x5 perc, PBS-Tween). Az előhívás Novared Peroxidase Substrate Kit-el történt (Vector Laboratory, SK-4800), ezt a cég által megadott recept alapján 5 ml UTV-be mértük össze. Mosás (3x5 perc PBS-Tween).

## **6. Fényképezés és képfeldolgozás**

Az elkészült metszetekről Zeiss Axiophot mikroszkóp segítségével, AxioCam HRC típusú kamerával digitális képeket készítettünk. A konfokális képek Bio-Rad Radiance 2001 Rainbow LCM típusú konfokális mikroszkóppal készültek. A további feldolgozás Adobe Photoshop CS2 9.0 típusú programmal történt.

## Eredmények

### **1. A 2H4-pozitív sejtek szöveti eloszlásának jellemzése a felnőtt madár szövetekben**

A 2H4 monoklonális ellenanyag (izotípusa: IgG3) által felismert molekula expresszióját először felnőtt csirke szövetekben vizsgáltuk. A felnőtt madár primer nyirokszervein (bursa, thymus) végzett festések alapján a 2H4 ellenanyag csak a hámsejteket jelölte. A bursa Fabricii-ből készített különböző fagyasztott metszetek immunhisztokémiai vizsgálata során felfigyeltünk a 2H4 minden eddigi általunk használt ellenanyaggal szembeni eltérő festésére, ezért vizsgálataink első szakaszában a különböző, hámsejtekre jellemző markereket (kereskedelmi és saját) is felhasználtunk a karakterizáláshoz.

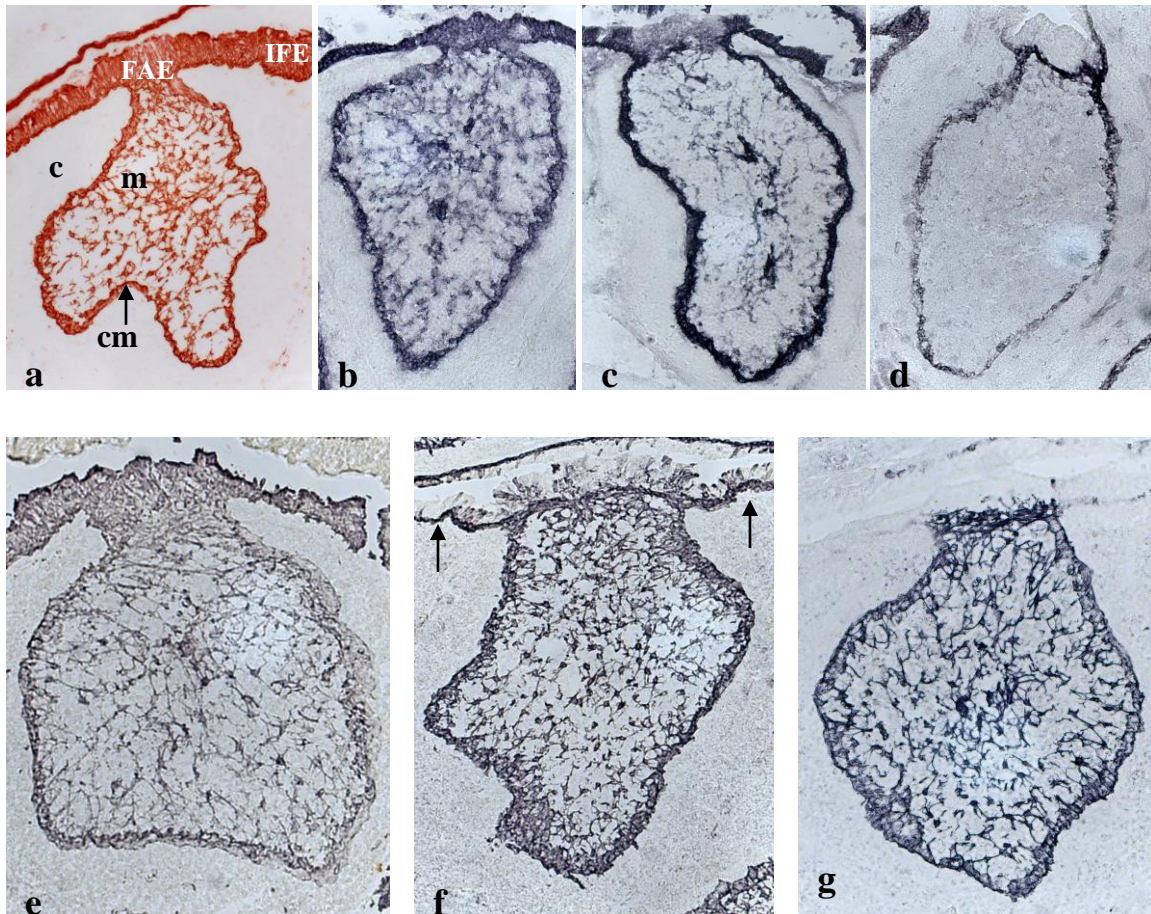
A kereskedelemben kapható madár hámsejtmarkerek sejtvez és adhéziós molekulákat jelölnek. A pán-cytokeratin ellenanyag a bursa folliculusok valamennyi epitheliális elemét (velő hámretikulum, FAE, IFE, kéreg-velő határ epithelium) festi (5. a ábra). Az E-cadherin és a Ben (bursa epithelium és neuron marker, Pourquoié et al. 1992) adhéziós fehérjék, a keratinokhoz hasonlóan valamennyi bursa hámsejt típusban kifejeződnek (5. b, c ábrák). Külföldi kollaborációból kapott K1-es, integrin-szerű fehérjét jelölő ellenanyag csak a folliculusok kéreg-velő határhámsejtjeit jelöli (5. d ábra). Laboratóriumunkban készült újabb ellenanyagokkal végzett festések szerint az 5E2 ellenanyag minden hámot festett (5. e ábra), míg a 9E2 az IFE basális sejtjeiben és a velőállomány hámretikulumában fordult elő (5. f ábra).

Összehasonlítva tehát a kereskedelemben kapható (5. a, b, c, d ábrák) és a laborunkban készült (5. e, f, g ábrák) bursa folliculus hámsejteket felismerő ellenanyagokat, kiderült, hogy a 2H4 a bursában csak a velőállomány hámretikulumát ismeri fel (5. g ábra).

A felnőtt szövetekben végzett karakterizálást a bursa Fabricii után a többi epitheliális szervre is kiterjesztettük. Azt tapasztaltuk, hogy a 2H4 ellenanyag a bursa

Fabricii folliculusok és a thymus velőállományának hámrétikulumát, valamint a bőr és többretegű laphámok germinatív sejtrétegét jelöli (6. ábra).

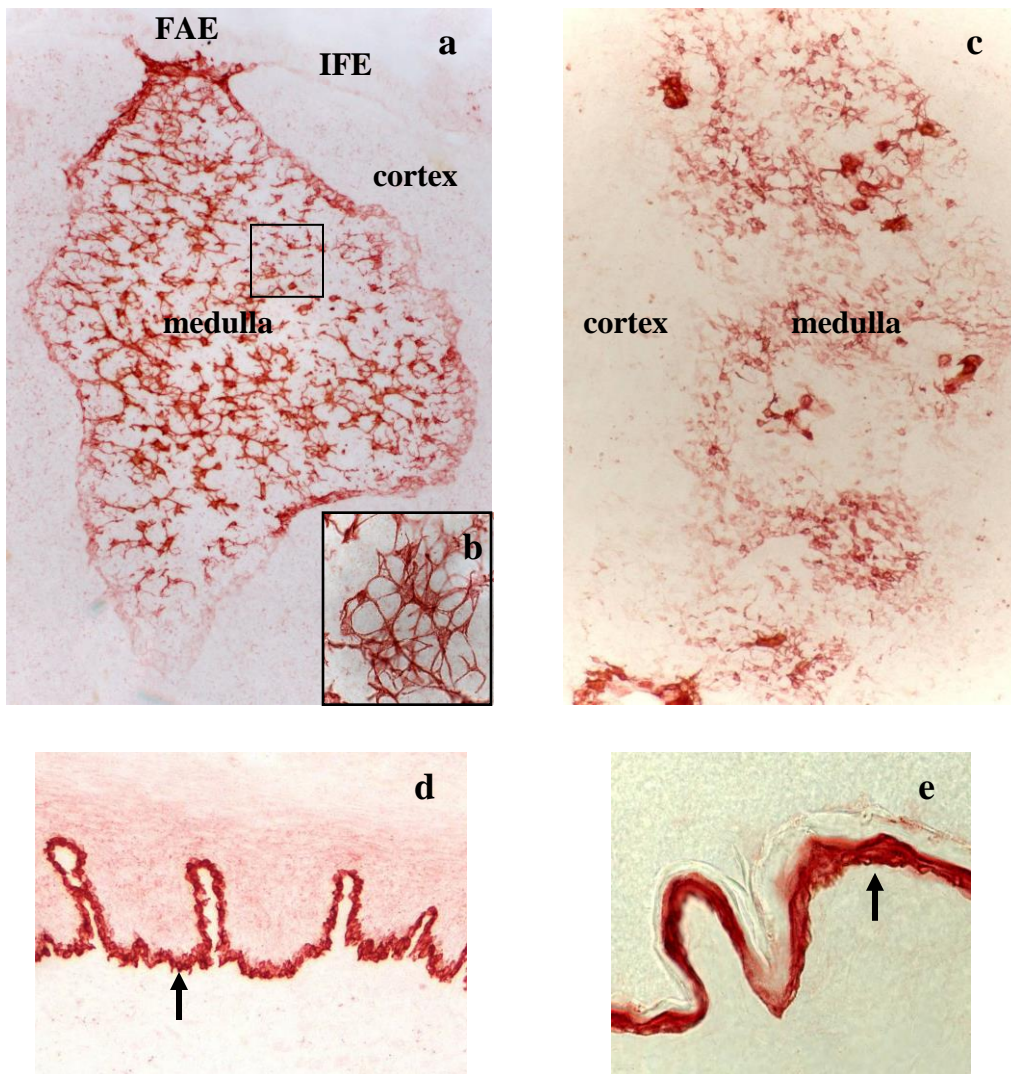
Kettős immunfluoreszcens festéssel összehasonlítottuk a 2H4 és a cytokeratin szövetbeni eloszlását a bursa folliculusokban, az oesophagusban és az oesophagus tonsillában (7. ábra). A kettős festéseken jól látszik, hogy a 2H4 és a cytokeratin a bursa folliculusok velőállományában, az oesophagus str. germinativumában és az oesophagus tonsillák hámrétikulum sejtjeiben kollokalizációt mutat.



**5. ábra:** A kereskedelembe kapható (a, b, c, d) és a laborunkban készült (e, f, g) hámsejteket felismerő ellenanyagok (a: cytokeratin, b: E-cadherin, c: Ben, d: K1, e: 5E2, f: 9E2, g: 2H4). a.) A cytokeratin kifejeződik a bursa Fabricii IFE, FAE, kéregvelő határ (cm) és a retikuláris hámsejtben. b.), c.) Hasonló festést mutat az E-cadherin és a Ben ellenanyag is. d.) A K1 ellenanyag a cm epitheliumot jelöli, e.) az 5E2 a cytokeratinhoz hasonlóan minden hámsejtben jelen van. f.) A 9E2 az IFE basális sejtsorában (nyilak) és a folliculus retikulumában expresszálódik. g.) a 2H4 kifejeződése csak a velőállomány hámrétikulumára korlátozódik.

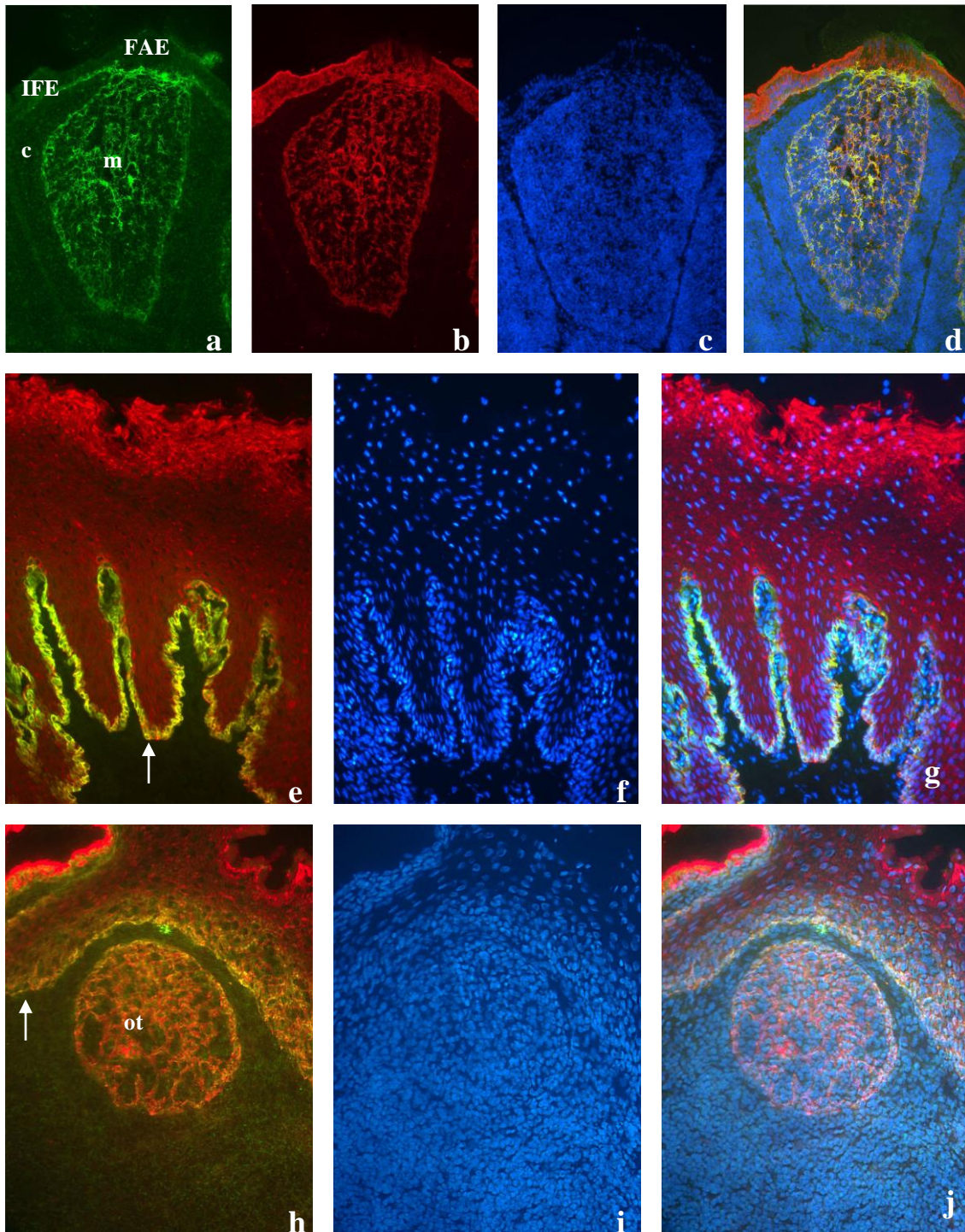
Az egyrétegű hámokban (vese, bélhám, máj, epeutak, coecalis tonsilla) a 2H4 nem fejeződik ki (2. táblázat).

A 2H4 molekula különböző fajokkal való keresztreakcióját gyöngytyúk, pulyka, hörcsög, patkány, béka, humán szövet (tonsilla) metszeteken vizsgáltuk. A 2H4 ellenanyag a madarakon kívül sem az emlősökkel, sem a kétélűekkel nem mutatott keresztreakciót (3. táblázat).



**6. ábra:** 2H4 expressziója felnőtt csirkében. **a.)** bursa folliculus, **b.)** bursa hámretikulum, **c.)** thymus, **d.)** oesophagus, **e.)** bőr. FAE: folliculus asszociált epithelium, IFE: interfollikuláris epithelium, a nyilak a stratum germinativumra mutatnak.





**7. ábra:** 2H4 és cytokeratin kettős immunfluoreszcens festés 6 hetes csirke bursa Fabriciiusán (a, b, c, d), oesophagusán (e, f, g) és oesophagus tonsilláján (h, i, j). **a.)**: 2H4 (zöld), **b.)**: cytokeratin (piros), **c.) f.) i.)** : DAPI sejtmagfestés (kék), **d.) g.) j.)**: hármas festés, **e.) h.)**: 2H4 és cytokeratin kettős festés. A bursa folliculusban a 2H4 és a cytokeratin molekulák a velőállomány retikulum sejtjeiben kollokalizálnak (a-d), az oesophagus többrétegű laphámsejtek közül kettős kifejeződés csak a str. germinativumra

korlátozódik (e-g), míg az oesophagus tonsillák lymphoid sejtekkel infiltrált hámcsapjának retikulum sejtei kettősen jelölődnek (h-j). FAE: folliculus asszociált epithelium, IFE: interfollikuláris epithelium, m: medulla, c: cortex, ot: oesophagus tonsilla, a nyílak a stratum germinativumra mutatnak.

	2H4	páncytokeratin
bőr	+	+
bursa	+	+
oesophagus	+	+
thymus	+	+
vese	-	+
bélhám	-	+
máj	-	+
epeutak	-	+

2. táblázat: a 2H4 expressziója

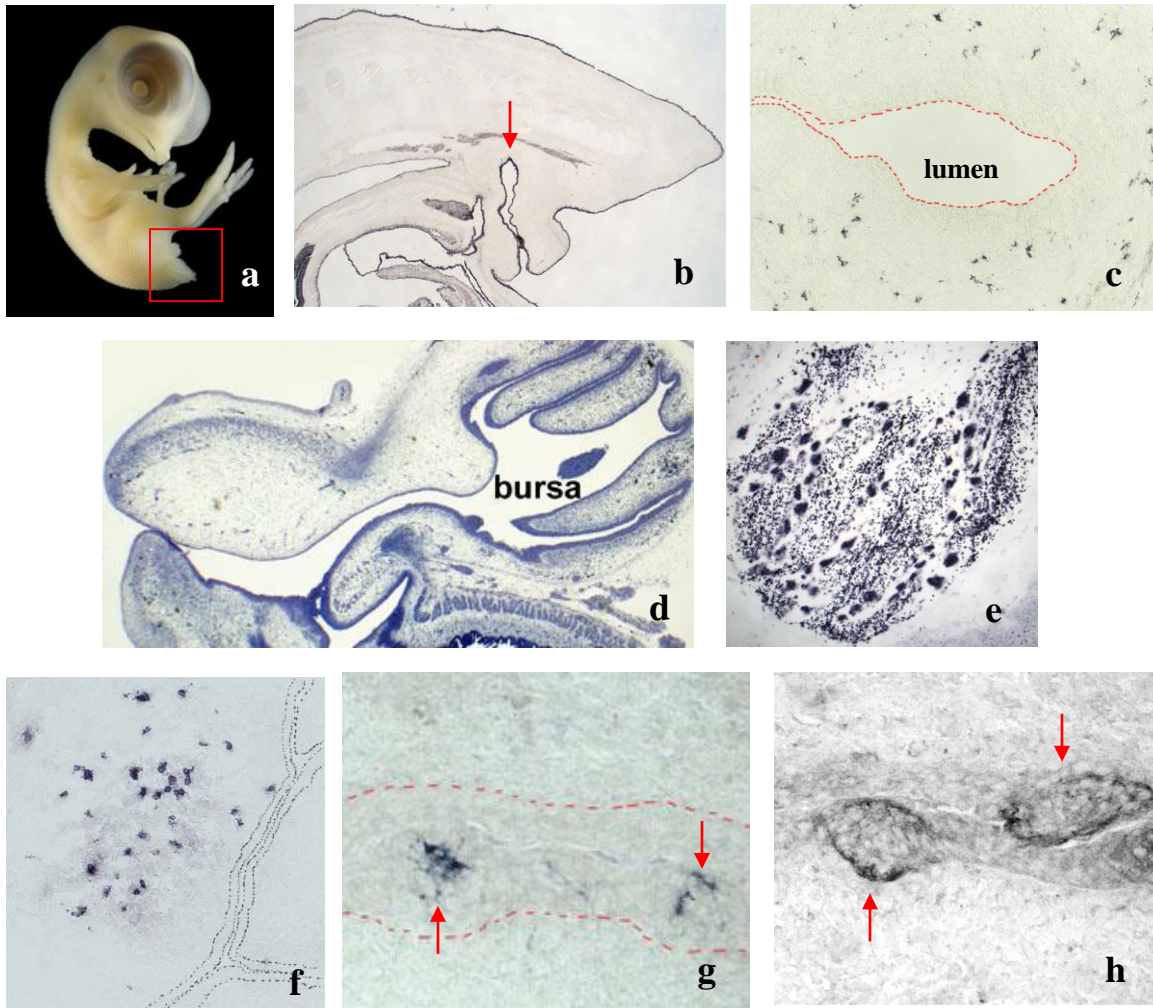
	2H4
csirke (bőr, bursa oesoph., thymus)	+
gyöngytyúk (bőr, bursa oesoph., thy.)	+
pulyka (bőr, bursa oesoph., thy.)	+
fürj (bőr, bursa oesoph., thy.)	+
hörcsög (thymus, oesoph., lép, bél)	-
patkány (thymus, oesoph., lép, bél)	-
béka (thymus, oesoph., lép, bél)	-
humán tonsilla	-

3. táblázat: a 2H4 keresztreakciója más fajokkal

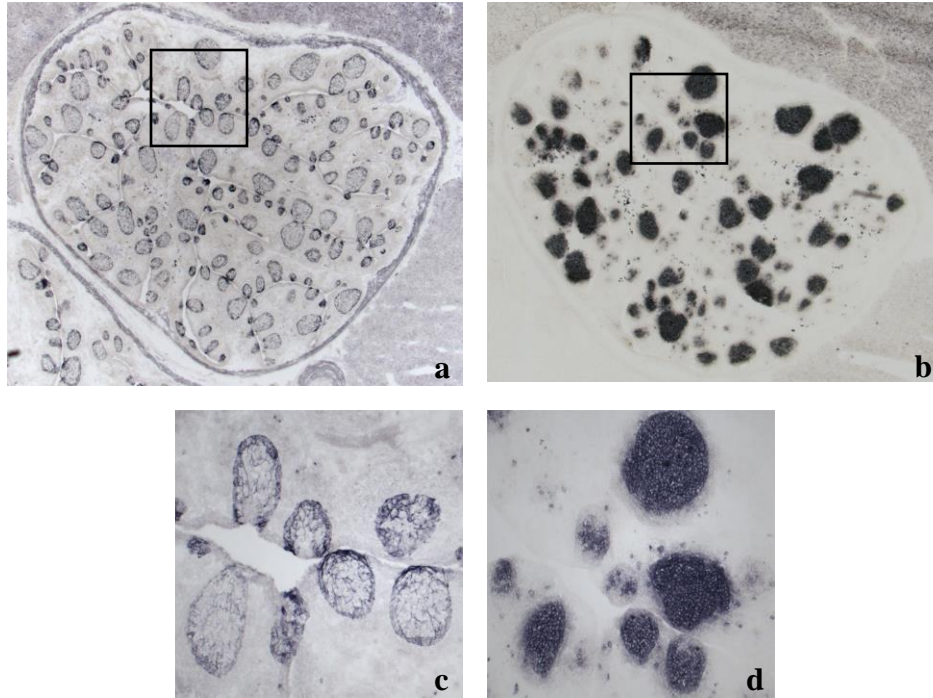
## 2. A 2H4-pozitív sejtek megjelenésének vizsgálata az embrionális fejlődés során

Különböző korú embriók felhasználásával megpróbáltuk kideríteni a 2H4-pozitív sejtek megjelenésének időpontját a csirkében. A 9 napos embrióban a bursa még csak egy alig tagolt üreg, a bursa telep CD45 pozitív hemopoetikus sejtei még nem léptek a cytokeratin pozitív hámba (8. a, b, c ábra). A következő néhány napban a bursa ürege tagolódik, redőzött lesz, mint ahogyan a toluidinkékkel festett képen látható (8. d ábra). A 12 napos embrióban a CD45 pozitív sejtek többsége a hámba vándorol és csoportokban koncentrálnak (8. e ábra). A felgyült CD45 pozitív sejtek helyén a felszíni hám a mesenchyma felé nyomul, míg a CD45 pozitív sejtek 74.3 pozitív sejtekké differenciálódnak. Ez a pillanat a folliculus indukció kezdete és a 2H4 pozitivitás bursában való megjelenésének első pillanata.

A 2H4 antigén tehát a folliculus epitheliumában a 12. napon jelenik meg, amit megelőz a 74.3 pozitív dentritikus sejtek bevándorlása a hámba, ami elindítja a hámbimbó képződését (8. g, h ábra). A Bu1b-vel jelzett B-sejtek ekkor még a hámon kívül találhatóak, csak később, a 2H4 pozitivitás megjelenése után lépnek a folliculusba.



**8. ábra:** A 2H4 által jelzett fehérje kifejeződése az embrionális fejlődés során. **a.)** 9 napos csirkeembrió **b.)** 9 napos embrió cytokeratinnal festett farokbimbó hosszmetsete, a nyíl a bursa lumenére mutat **c.)** 9 napos embrió, CD45-el jelzett hemopoetikus sejtek a bursában, ebben a korban még nem lépnek a hámba, csak a közelében helyezkednek el. **d.)** 11 napos embrió farokbimbó, toluidinkék festés, **e., f., g., h.:** 12 napos embriók bursájából készült metsetek, **e.)** CD45 pozitív hemopoetikus sejtek elszórtan és csoportosan a bursa Fabricii telepében, **f.)** a Bulb pozitív B-sejtek a hámtól távol lokalizálódnak (szaggatott vonallal a hám van jelezve) **g.)** 74.3 pozitív dendritikus sejtek a hámban (a hám szaggatott vonallal van jelölve), a nyilak a dendritikus sejtek tömörüléseire mutatnak. **h.)** 2H4 pozitív folliculusbimbók (nyilak) a hámban.



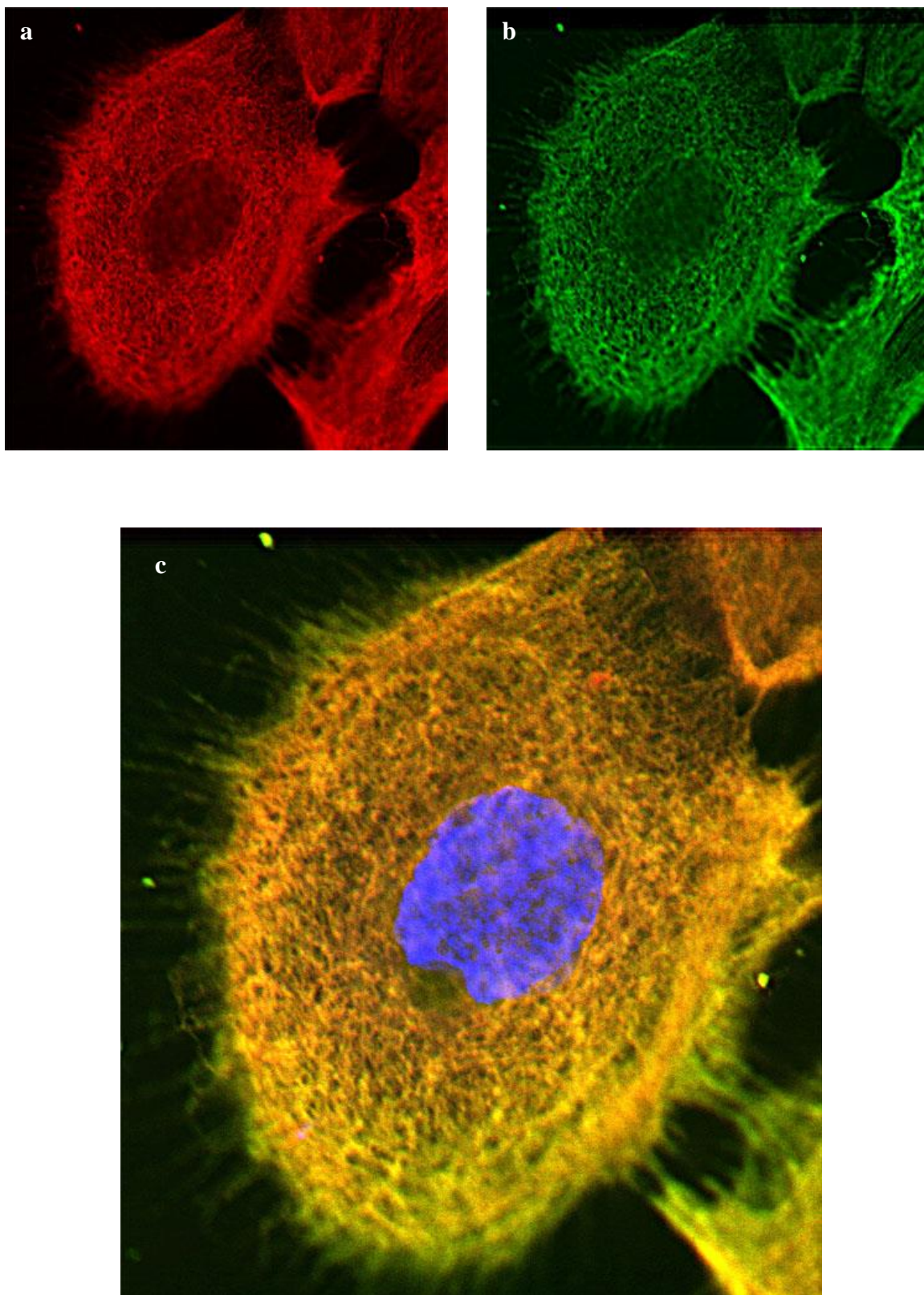
**9. Ábra:** 2H4-el és Bu1b-vel festett 16 napos csirkeembrió bursája. **a.), c.):** 2H4 pozitív hámretikulum, **b.), d.):** Bu1b pozitív B-sejtekkel infiltrált folliculusok.

A 16 napos embrióban a bursa folliculusok még különböző érési stádiumokban vannak, de valamennyi Bu1b pozitív sejtekkel feltöltött folliculusbimbó hámretikuluma 2H4 pozitív.

### 3. A 2H4 pozitív fehérje sejtbeli lokalizációjának meghatározása

A 2H4 által felismert fehérje sejtben belüli elhelyezkedésének meghatározására bőrből készült hámsejttenyészetből származó sejteket immunfluoreszcensen festettünk meg (10. ábra).

A vizsgálat során azt találtuk, hogy a 2H4 által jelölt fehérje citoplazmatikus és filamentáris kifejeződést mutat. Lokalizációja átfed a páncytokeratin ellenanyag által jelzett keratin fehérjékkal.

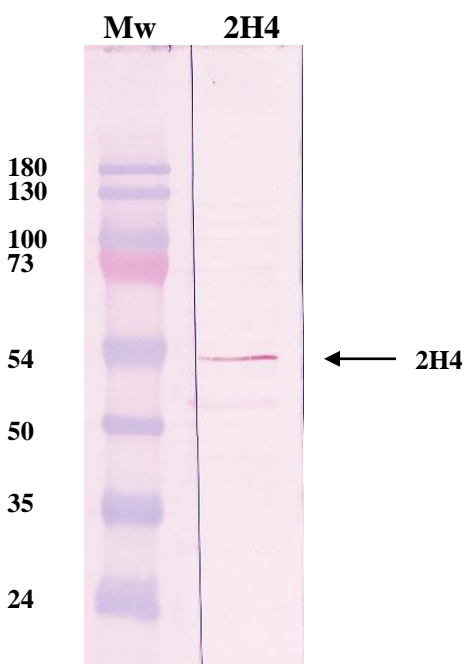


**10. Ábra:** *Hármas fluoreszcensen jelölt, tenyésztett bőrhámsejt. a.)* cyokeratin (piros), *b.)* 2H4 (zöld), *c.)* 2H4 és cyokeratin kettős festés, a sejtmag DAPI-val jelölve (kék),

#### 4. A 2H4 pozitív fehérje molekulatömegének meghatározása

Molekulatömegét hámsejtlizátumból határoztuk meg gélelektorforézissel és Western-blottal. A hámsejteket felnőtt csirke szárny alatti, tollmentes területéről izoláltuk, csíkokra vágtuk, diszpázt tartalmazó RPMI médiumban inkubáltuk, majd az epidermiszt elválasztottuk a dermisztől. Tripszines emésztés után a sejteket komplett RPMI médiumba vettük fel és sejtenyészetbe helyeztük. 4-5 nap után a sejteket RIPA pufferbe tettük. A kapott fehérjelizátumot lecentrifugáltuk és felüliszóját használtuk fel a gélelektroforézis és a blottolás során.

A 2H4 által jelzett fehérje molekulatömege 54 kD.



11. Ábra: A 2H4 fehérje kimutatása Western blottal

## **Eredmények megvitatása és következtetések**

Munkánk során az IgG3 izotípusú, 2H4 elnevezésű ellenanyag karakterizálását végeztük el immuncitokémiával és Western-blot analízissel. Ez az ellenanyag a bursa Fabricii folliculusok és a thymus velőállományának hámrétikulumát valamint, a bőr és többrétegű laphám germinatív sejtrétegét jelöli madarakban.

A primer nyirokszervekben a 2H4 antigén elsősorban a B-lymphocyták által infiltrált retikuláris hámszövetben fejeződik ki. Ezt támasztja alá, hogy a bursa Fabricii-ben a 2H4 antigén expresszióját a vér eredetű dendritikus sejt prekurzorok infiltrációja megelőzi, azaz feltételezhetően a dendritikus sejtek jelenléte szükséges a 2H4 antigén kifejeződéséhez; a B-sejtek már a 2H4 pozitív folliculus bimbókat kolonizálják. A thymus velőállományának hámrétikuluma expresszálja a 2H4 pozitív antigént, ahol B-lymphocyták jelentős számban találhatóak, ellentétben a thymus 2H4 negatív, B-sejt mentes kéregállományával.

Fontos lenne a jövőben meghatározni a 2H4 antigén és a B-sejtek viszonyát. Ez a jelenség annál is érdekesebb, mert a lymphoid sejtekkel infiltrált laphám valamennyi rétege 2H4 pozitív, míg a többrétegű hámszövetekben csak a stratum germinativum expresszálja, amely a differenciálódás során lecseng és a stratum spinosum már nem pozitív.

In vivo és in vitro hámsejt tenyészetekben a 2H4 ellenanyag citoplazmatikus, filamentum-szerű festődést mutatott, ami arra utal, hogy a hámsejtekre jellemző intermedier filamentumot ismert fel az ellenanyag. A páncytokeratinnal végzett párhuzamos vizsgálatok is azt mutatták, hogy a két fehérje festési mintázata sejten belül hasonló. Felmerült, hogy egy keratin-szerű fehérjét jelölhet a 2H4 ellenanyag. Ezt a feltételezésünket támogatja továbbá az a tény, hogy a 2H4 antigén 54 kDa-os molekulatömegével is beleillik a keratinok osztályába.

A keratin intermedier filamentumok a hámféleségekre jellemzőek. A keratinokat alkotó aminosavak töltésviszonyaik szerint, savanyú, semleges és bázikus keratinokra oszthatók. Megkülönböztetünk I és II típusú keratinokat. A I típusúak a savanyúak, molekulatömegük 40 kDa és 64 kDa között van. A II típusúakhoz a semleges vagy

savanyú töltésűek tartoznak (52 kD és 67 kD között). Az 50-58 kD-os keratinok általában a többrétegű laphámok bazális germinatív sejtrétegében vannak jelen (Nelson and Sun, 1983). A szakirodalomban leírt és a forgalomban lévő keratin izoformákat jelölő ellenanyagok nagy része emlős specifikus, a madárra vonatkozó adat kevés. Találtunk néhány olyan emlősökben leírt keratint, aminek molekulatömege és festődése hasonló a 2H4 madár szövetekben mutatott eloszlásához.

A tonsilla palatina lymphoid sejtekkel infiltrált retikuláris epitheliuma 5-ös (58 kD) és 19-es (40 kD) keratint fejez ki, míg a szomszédos többrétegű laphámban kifejeződésük a germinatív sejtrétegre korlátozódik (Reibel and Sorensen, 1991). Molekulatömeg és festődési mintázat alapján tehát az 5-ös keratinhoz hasonlít legjobban a 2H4.

A 2H4-et kipróbáltuk emlős szöveteken (egér, patkány, hörcsög, humán tonsilla), kiderült, hogy más gerinces osztály tagjával nem mutat keresztreakciót, tehát az ellenanyag egy konzervatív epitópot jelöl.

A következőkben különböző 5-ös keratint felismerő mono- és polyklonális ellenanyagok madár szövetekben való tesztelésével folytatjuk a 2H4 ellenanyag karakterizálását.

## **Következtetések**

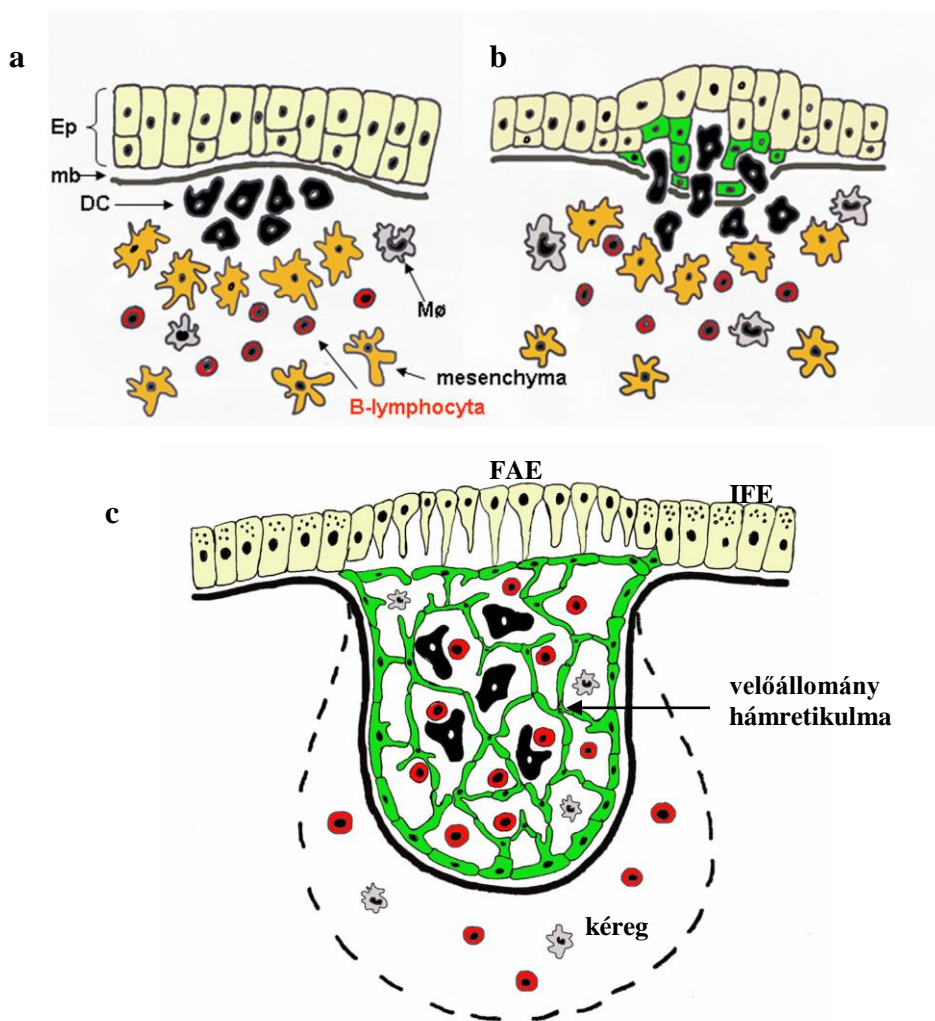
Összegzésként elmondhatjuk, hogy a 2H4 egy olyan új egér monoklonális ellenanyag, ami szelektíven jelöli a bursa hámrétikulumát, a B-sejtekkel infiltrált háموkat és a többrétegű háموk germinatív sejtrétegét madarakban.

A 2H4 pozitív molekula sejten belüli filamentáris elrendeződése a keratin intermedier fehérjékre hasonlít.

Bursa Fabriciiben expresszióját megelőzi a dendritikus sejtek belépése a felszíni hámba. A B-lymphocyták bevándorlása a hámba csak a 74.3 pozitív dendritikus sejtek hámba való belépése, és a 2H4 által jelzett fehérje megjelenése után következik be.



A bursa folliculusok 2H4 kifejeződése a hámretikulum sejtekben felnőtt madarakban is megmarad, más bursa epithel sejtekben nem jelenik meg. Ezáltal alkalmas eszköz lehet a bursa folliculus hámsejtek vizsgálatára, hiszen eddig nincs olyan marker, amely szelektíven, kizárólag a folliculusok hámretikulumát jelölné (12. ábra).



**12. Ábra:** Sémás rajz a bursa folliculusok 2H4 pozitív hámretikulumának kialakulásáról. a.), b.) a 2H4 pozitív molekula kifejeződése (zöld hámsejtek) a bursa Fabricii epitheliumában a dendritikus sejtek kolonizációját követően jelenik meg. c.) a bursa velőállomány 2H4 pozitivitása a hámretikulum sejtekben. DC: dendritikus sejtek, Ep: epithelium, FAE: folliculus asszociált epithelium, IFE: interfollikuláris epithelium, mb: bazális membrán, MØ: makrofág.

## **Köszönetnyilvánítás**

*Köszönettel tartozom két kedves témavezetőmnek, Dr. Nagy Nándornak, a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet kutatójának, Prof. Dr. Oláh Imre egyetemi tanárnak, akik munkám során mindvégig támogattak, mellettem álltak és egyengették utamat.*

*Szeretnék köszönetet mondani a Fejlődésbiológiai laboratórium összes munkatársának, akik segítségükkel hozzájárultak szakdolgozatom elkészítéséhez, különösképpen Ígyártó Botondnak, aki elméleti és gyakorlati tudásával, barátságával mindvégig a segítségemre volt.*

*Köszönettel tartozom konzulensemnek Dr. László Lajosnak, az Eötvös Loránd Tudományegyetem Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék docensének, dolgozatom elkészítéséhez nyújtott segítségéért.*

*Végül, de nem utolsósorban, köszönettel tartozom családomnak, akik mindig mellettem álltak, buzdítottak és támogattak.*

---

## IRODALOMJEGYZÉK

- Betti F. (1989). Development of the cloacal bursa in the domestic fowl. I. An allometric and morphological study of the interfollicular surface epithelium (ISE). *Anat. Anz.*, 168: 337-46.
- Cogburn L.A., Glick B. (1983). Functional lymphocytes in the chicken pineal gland. *J. Immunol.*, 130: 2109-12.
- Davenport W.D. Jr., Allen E.R. (1995). Dome Epithelium and Follicle-Associated Basal Lamina Pores in the Avian Bursa of Fabricius. *Anat. Rec.*, 241: 155-162.
- Jeurissen S.H., Janse E.M., Koch G., De Boer G.F. (1989). Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. *Cell Tissue Res.*, 258: 119-124.
- Hoshi S., Nunoya T., Ueda S. (1987). Identification of B-L Antigens on Reticular Epithelial Cells of the Bursa of Fabricius. *Microbiol. Immunol.*, 32: 173-186.
- Houssaint E., Diez E., Pink J.R. (1987). Ontogeny and tissue distribution of the chicken Bu-1a antigen. *Immunology*, 62: 463-70.
- Houssaint E., Mansikka A., Vainio O. (1991). Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo. *J. Exp. Med.*, 174: 397-406.
- Glick B. (1983). The Saga of the Bursa of Fabricius. *BioScience.*, 187-191
- Kittner Z., Oláh I. (1980). Contribution of chicken's central lymphoid organs to the cellular composition of the gland of Harder. *Acta. Biol. Acad. Sci. Hung.*, 31: 177-85.

- Le Douarin M.N., Houssaint F., Jotereau F.V., Belo M. (1975). Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras. *P.N.A.S. USA*, 72: 2701-2705.
- Lupetti M., Dolfi A. (1982). A Contribution to the Study of the Lymphoid-follicle Associated Epithelial Cells. *Z. mikrosk.-anat. Frosch.*, 96: 214-220.
- Lupetti M., Dolfi A., Giannessi F., Michelucci S. (1986). A contribution to the study of the histogenesis of the bursal lymphoid follicles in *Gallus domesticus*. *Anat. Anz.*, 162: 83-92.
- Lupetti M., Dolfi A., Giannessi F., Bianchi F., Michelucci S. (1990). Reappraisal of histogenesis in the bursal lymphoid follicle of the chicken. *Am. J. Anat.*, 187: 287-302.
- Masteller E.M., Thompson C.B. (1994). B Cell Development in the Chicken. *Poultry Sci.*, 73: 998-1011.
- Miller S.A., Briglin A. (1996). Apoptosis removes chick embryo tail gut and remnant of the primitive streak. *Dev. Dyn.*, 206: 212-8.
- Morimura T., Miyatani S., Kitamura D., Goitsuka R. (2001). Notch signaling suppresses IgH gene expression in chicken B cells: implication in spatially restricted expression of *Serrate2/Notch1* in the bursa of Fabricius. *J. Immunol.*, 166:3277-83.
- Nagy N., Magyar A., Dávid Cs., Gumati M.K., Oláh I. (2001). Development of Follicle-Associated Epithelium and the Secretory Dendritic Cell in the Bursa of Fabricius of Guinea Fowl (*Numida meleagris*) Studied by Novel Monoclonal Antibodies. *Anat. Rec.*, 262: 279-292.

- Nagy N., Magyar A., Tóth M., Oláh I. (2004a). Origin of the bursal secretory dendritic cell. *Anat. Embryol.*, 208: 97-107.
- Nagy N., Magyar A., Tóth M., Oláh I. (2004b). Quail as the Chimeric Counterpart of the Chicken: Morphology and Ontogeny of the Bursa of Fabricius. *J. Morph.*, 259: 328-339.
- Nagy N., Igyártó B., Magyar A., Gazdag E., Palya V., Oláh I. (2005). Oesophageal tonsil of the chicken. *Acta Vet. Hung.*, 53: 173-188.
- Nagy N., Oláh I. (2007). Pyloric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken. *J. Anat.* (in press).
- Nelson W.G., Sun T.T. (1983). The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J. Cell Biol.*, 97: 244-51.
- Oláh I., Glick B. (1978). Secretory cell in the medulla of the bursa of Fabricius. *Experientia.*, 34: 1642-3.
- Oláh I., Glick B. (1979). Structure of the germinal centers in the chicken caecal tonsil: light and electron microscopic and autoradiographic studies. *Poult. Sci.*, 58: 195-210.
- Oláh I., Glick B., Taylor R.L. Jr. (1984). Meckel's diverticulum. II. A novel lymphoepithelial organ in the chicken. *Anat. Rec.*, 208: 253-263.
- Oláh I., Glick B., Taylor R.L. Jr. (1985). Effect of surgical bursectomy on the ellipsoid, ellipsoid-associated cells, and periellipsoid region of the chicken's spleen. *J. Leukoc. Biol.*, 38: 459-69.

- Oláh I., Glick B., Toro I. (1986). Bursal development in normal and testosterone-treated chick embryos. *Poult. Sci.*, 65: 574-88.
- Oláh I., Glick B. (1992). Follicle-Associated Epithelium and Medullary Epithelial Tissue of the Bursa of Fabricius Are Two Different Compartments. *Anat. Rec.*, 233: 577-587.
- Oláh I., Glick B. (1992). Dynamic changes in the intermediate filaments of the epithelial cells during development of the chicken's bursa of Fabricius. *Poult. Sci.*, 71: 1857-72.
- Oláh I., Kendall C., Glick B. (1992). Differentiation of bursal secretory-dendritic cells studied with anti-vimentin monoclonal antibody. *Anat. Rec.*, 233: 111-20.
- Oláh I., Glick B. (1995). Dendritic cells in the bursal follicles and germinal centers of the chicken's caecal tonsil express vimentin but not desmin. *Anat. Rec.*, 243: 384-9.
- Oláh I., Nagy N., Magyar A., Palya V. (2003). Esophageal tonsil: novel gut-associated lymphoid organ. *Poultry Sci.*, 82: 767-770.
- Otsubo Y., Chen N., Kajiwara E., Horiuchi H., Matsuda H., Furusawa S. (2001). Role of bursin in the development of B lymphocytes in chicken embryonic Bursa of Fabricius. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 485-493.
- Pourquoié O., Corbel C., Le Caer J.P., Rossier J., Le Douarin N.M. (1992). BEN, a surface glycoprotein of the immunoglobulin superfamily, is expressed in a variety of developing systems. *P.N.A.S. USA*, 89: 5261-5265.

- Reynaud C.A., Mackay C.R., Muller R.G., Weill J.C. (1991). Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches. *Cell*, 64: 995-1005.
- Quesada J., Aquilleiro B., Lozano M. T. (1985). Ultrastructure of the granulopoietic microenvironment in the tunica propria of the bursa of Fabricius of white leghorn chicken embryo. *J. Submicrosc. Cytol.*, 17: 537-540.
- Sanchez-Refusta F., Ciriaco E., Germana A., Germana G., Vega J.A. (1996). Age-Related Changes in the Medullary Reticular Epithelial Cells of the Pigeon Bursa of Fabricius. *Anat. Rec.*, 246: 473-480.
- Reibel J., Sorensen C.H. (1991). Association between keratin staining patterns and the structural and functional aspects of palatine tonsil epithelium. *APMIS.*, 99: 905-15.
- Tar E., Oláh I., Törő I. (1968). Cell migration in the developing follicle of the bursa of Fabricius between cortex and medulla. *Acta biol. Acad. Sci. Hung.*, 20: 93-99.
- Viamontes G.I., Audhya T.K., Babu U., Goldstein G. (1989). Immunohistochemical localization of bursin in epithelial cells of the avian bursa of Fabricius. *J. Histochem Cytochem.*, 37: 793-9.
- Weinstein P.D., Mage R.G., Anderson A.O. (1994). The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 355: 249-53.
- Wilson T.J., Boyd R.L. (1990). The ontogeny of chicken bursal stromal cells defined by monoclonal antibodies. *Dev. Immunol.*, 1: 31-9.