SEMMELWEIS EGYETEM

DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2840.

PECSENYE-FEJSZÁK NÓRA FLORINA

Embriológia, elméleti, kísérletes és klinikai fejlődésbiológia
című program

Programvezető: Dr. Nagy Nándor, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Nagy Nándor, egyetemi tanár

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

Doktori értekezés

Pecsenye-Fejszák Nóra Florina

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Nagy Nándor DSc, egyetemi tanár

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

Komplex vizsga szakmai bizottság:
Elnök: Dr. Buzás Edit, DSc, egyetemi tanár
Tagok: Dr. Jakus Zoltán Péter, PhD, egyetemi docens
Dr. Gócza Elen, DSc, tudományos tanácsadó

Budapest
2023

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 6

2. BEVEZETÉS 7

2.1. A madarak jellegzetes primer nyirokszerve: a bursa Fabricii 8

2.1.1. Bursa Fabricii immunológiai jelentősége 8

2.1.2. A bursa Fabricii általános felépítése 8

2.1.3. A bursa Fabricii follikulusainak szöveti szerkezete 10

2.1.4. A bursa Fabricii embrionális fejlődése 15

2.2. A madarak B lymphocytáinak fejlődése 19

2.2.1. A B lymphocyta progenitorok determinációja, érési lépései 19

2.2.2. A B lymphocyták migrációját befolyásoló molekulák és a CXCR4/CXCL12 szignalizáció szerepe a B lymphopoiesisben 25

3. CÉLKITŰZÉSEK 31

4. MÓDSZEREK 32

4.1. Kísérleti állatok 32

4.2. Minták szövettani feldolgozása 32

4.3. Zselatin-szacharózos fagyasztott blokk készítése 33

4.4. Műgyantás blokk készítése 33

4.5. Beágyazáshoz használt oldatok 34

4.6. Metszet készítése 35

4.7. Vérkenet készítése 35

4.8. 7H3 monoklonális ellenanyag készítése 35

4.8.1. 7H3-as hybridoma sejttenyésztése és felülúszójának gyűjtése 36

4.8.2. 7H3 ellenanyagot tartalmazó felülúszó tisztítása 37

4.8.3. 7H3 monoklonális ellenanyag gyűjtéséhez használt oldatok 37

4.9. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia 38

4.9.1. Immunhisztokémia 38
4.9.2. Immunfluoreszcencia 39
4.9.3. Az immunfestés során alkalmazott primer és szekunder ellenanyagok, előhívószerek, oldatok 40
4.9.4. Immunhisztokémiához és egyéb szövettani festésekhez felhasznált oldatok 42
4.10. Metszetek értékelése és képfeldolgozás 43
4.11. SDS gélelektroforézis és Western blot 43
4.11.1. Minta 43
4.11.2. Lizátum készítése 43
4.11.3. Minta előkészítése 44
4.11.4. Gélek összemérése 44
4.11.5. SDS gélelektroforézis futtatás 45
4.11.6. Blottolás nitrocellulóz membránra 45
4.11.7. Immunjelölés 46
4.11.8. Lizátum készítéshez és Western blotthoz használt oldatok és előhívószerek 46
4.12. Szikhólyag *in ovo* tenyésztése 47
4.13. Ellenanyag-antigén kapcsolódásán alapuló funkció blokkoló vizsgálatok.... 47
4.13.1. 7H3 ellenanyaggal injektált bursa Fabricii fenntartása chorioallantois membrán transzplantáció alkalmazásával 48
4.13.2. *In vitro* B lymphocyta migrációs teszt 49
5. EREDMÉNYEK 51
5.1. 7H3 ellenanyaggal jelölt sejtek eloszlásának meghatározása kifejlett gyöngytyúk nyirokszerveiben. 51
5.1.1. 7H3 antigén expressziós mintázata a gyöngytyúk primer nyirokszerveiben (bursa Fabricii és thymus) 51
5.1.2. A 7H3 antigén expressziója kifejlett gyöngytyúk szekunder nyirokszerveiben. 55
5.2. 7H3 pozitív sejtek vizsgálata a gyöngytyúkok embrionális fejlődése során . 59

5.2.1. A 7H3 pozitív sejtek megjelenése a korai gyöngytyúk embrióban.....59
5.2.2. A 7H3 antigén expressziója a gyöngytyúk bursa Fabricii fejlődése során 63
5.3. 7H3 antigén expressziója csirke bursa Fabricii-ben 65
5.4. A 7H3 antigén és a CXCR4 receptor expressziós mintázatának összehasonlítása gyöngytyúk és csirke bursa Fabricii-ben 67
5.4.1. Gyöngytyúk és csirke CXCR4 receptor expressziós mintázatának összehasonlítása a bursalis B lymphocytákon.....67
5.4.2. A gyöngytyúk bursalis B lymphocytáira jellemző CXCR4 receptor és 7H3 antigén expressziós mintázatának összehasonlítása.....71
5.5. 7H3 antigén funkció blokkoló vizsgálata 73
5.5.1. 7H3 ellenanyag hatása a B lymphocyták bursa telepének kolonizációjára73
5.5.2. *In vitro* sejtmigráció vizsgálata 7H3 ellenanyag és CXCL12 kemoattraktáns együttes alkalmazása mellett 75
5.6. A 7H3 ellenanyag által jelölt antigén molekulatömegének meghatározása .. 77
6. MEGBESZÉLÉS 78
6.1. A 7H3 monoklonális ellenanyag egy B lymphocyta alpopulációt jelöl..... 78
6.2. A 7H3 ellenanyag jelöli a korai vérképző őssejteket. 82
6.3. 7H3 antigén a B lymphocyták migrációját szabályozó molekula. 85
7. KÖVETKEZTETÉSEK 89
8. ÖSSZEFOGLALÁS 90
9. SUMMARY 91
10. IRODALOMJEGYZÉK 92
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 116
11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk 116
11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk 116
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 117

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC: avidin-biotin-peroxidáz komplex (Avidin-Biotin Complex)

BSA: borjú szérum albumin (Bovine Serum Albumin)

BSDC: bursai szekréciós dendritikus sejt (Bursal Secretory Dendritic Cell)

CAM: chorioallantois-membrán (ChorioAllantoic Membrane)

CD: differenciációs klaszter (Cluster of Differentiation)

chBAFF: emlős BAFF csirke homológja (Chicken homologue of mammalian BAFF)

CSF1R: kolónia stimuláló faktor 1 receptor (Colony Stimulatory Factor 1 Receptor)

CXCL12: C-X-C kemokin ligand 12 (C-X-C motif chemokine Ligand type 12) (=SDF-1)

CXCR4: C-X-C kemokin receptor 4 (C-X-C motif chemokine Receptor type 4)

D: kikelés utáni nap (Day after hatching)

DAPI: 4,6 diamidino-2-fenilindol (4,6 DiAmidino-2-PhenylIndole)

E: embrionális nap (Embryonic day)

FAE: follikulus-asszociált epithelium (Follicle-Associated Epithelium)

HH: Hamburger-Hamilton szerinti stádiumbeosztás (Hamburger-Hamilton stages)

HSC: hematopoietikus őssejt / vérképző őssejt (Hematopoietic Stem Cell)

IAHC: intra-aortikus hematopoietikus klaszter (Intra-Aortic Hematopoietic Cluster)

IFE: interfollikuláris epithelium (InterFollicular Epithelium)

MHC: fő hisztokompatibilitási komplex (Main Histocompatibility Complex)

PALS: periarterioláris lymphoid hüvely (PeriArteriolar Lymphatic Sheath)

PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat (Phosphate-Buffered Saline)

PFA: paraformaldehid oldat (ParaFormAldehyde)

PWP: periellipszoidális fehérállomány (Periellipsoid White Pulp)

RPMI Medium: Roswell Park Memorial Institute 1640 sejttenyésztő médium (Roswell Park Memorial Institute 1640 cell culture medium)

SDF-1: stroma sejt eredetű faktor 1 (Stromal cell-Derived Factor 1) (=CXCL12)

2. BEVEZETÉS

A gerincesek adaptív immunitása az egyed egész életében folyamatosan fejlődik, alkalmazkodik az újabb vagy módosult kórokozókhoz, elősegítve a szervezet hatékony védekezését és alkalmazkodást a megváltozott környezethez. Az elmúlt évtizedekben robbanásszerűen fejlődő immunológiai kutatások széleskörben tárták fel immunrendszerünk működését. Hangsúlyozandó, hogy a humorális immunitás létezését először madarakban sikerült azonosítani. Ettől számítva tudjuk, hogy az adaptív immunrendszer működése funkcionálisan két részre: humorális és celluláris immunválaszra oszlik.

Az emlősök mellett rövid időn belül madarak is az immunológiai és a fejlődésbiológiai kutatások elterjedt modell állatává váltak, ugyanis tojásban történő fejlődésük, az embriók könnyebb hozzáférhetőségét eredményezi, amely széles spektrumú lehetőséget nyújt az embriómanipulációs technikák megvalósítására. Továbbá, az emlősöktől eltérően a madarak lymphocytáinak differenciálódása a thymus mellett nem a csontvelőben, hanem egy specifikus bélhez asszociált nyirokszervben, a bursa Fabriciiben zajlik (Glick et al., 1956; Cooper et al., 1965; Gitlin & Nussenzweig, 2015; Nagy et al., 2022). A morfológiai megfigyelés mellett embriómanipulációt is alkalmazó kutatások elsőként igazolták, hogy a „bursa eredetű lymphocyták" (B lymphocyták) jelentős szerepet játszanak az ellenanyagok termelésében (Cooper et al., 1965). A bursa Fabricii a madarak olyan primer lympho-myeloid szerve, ahol a B lymphocyták differenciálódása és érése más lymphoid, myeloid és erythroid sejtvonalak fejlődésétől szeparáltan történik (Glick, 1994). A B lymphocytákra specializált bursa Fabricii szerv több olyan kutatási lehetőségeket is kínál, amelyet emlősök esetén az *in vitro* körülmények között csak korlátozott ideig fenntartható B sejteken nem sikerült vizsgálni. A bursa Fabricii ugyancsak alkalmas szerv azoknak a molekuláris mechanizmusoknak a feltárására, amelyek kifejezetten a B lymphocyták ontogenezisét befolyásoló szöveti környezet kialakulását szabályozzák.

A lymphocyták fejlődését irányító mikrokörnyezet és a lymphoid sejtek karakterizálását célzó alapkutatások rutinszerűen használt eszközei a monoklonális ellenanyagok, amelyek alkalmasak egy adott sejttípus azonosítására és szöveten belüli lokalizációjának meghatározására. A hematológiai betegségek nagy száma és változatossága miatt egyre nagyobb az igény a hematopoietikus sejteket specifikusan

felismerő monoklonális ellenanyagokra, amelyek hasznos eszközök lehetnek a vérképzés és a lympho-myeloid sejtek differenciálódásának nyomon követésére, elősegítve a humán gyógyászatban alkalmazható célzott terápiás kezelések kifejlesztését.

2.1. A madarak jellegzetes primer nyirokszerve: a bursa Fabricii

2.1.1. Bursa Fabricii immunológiai jelentősége

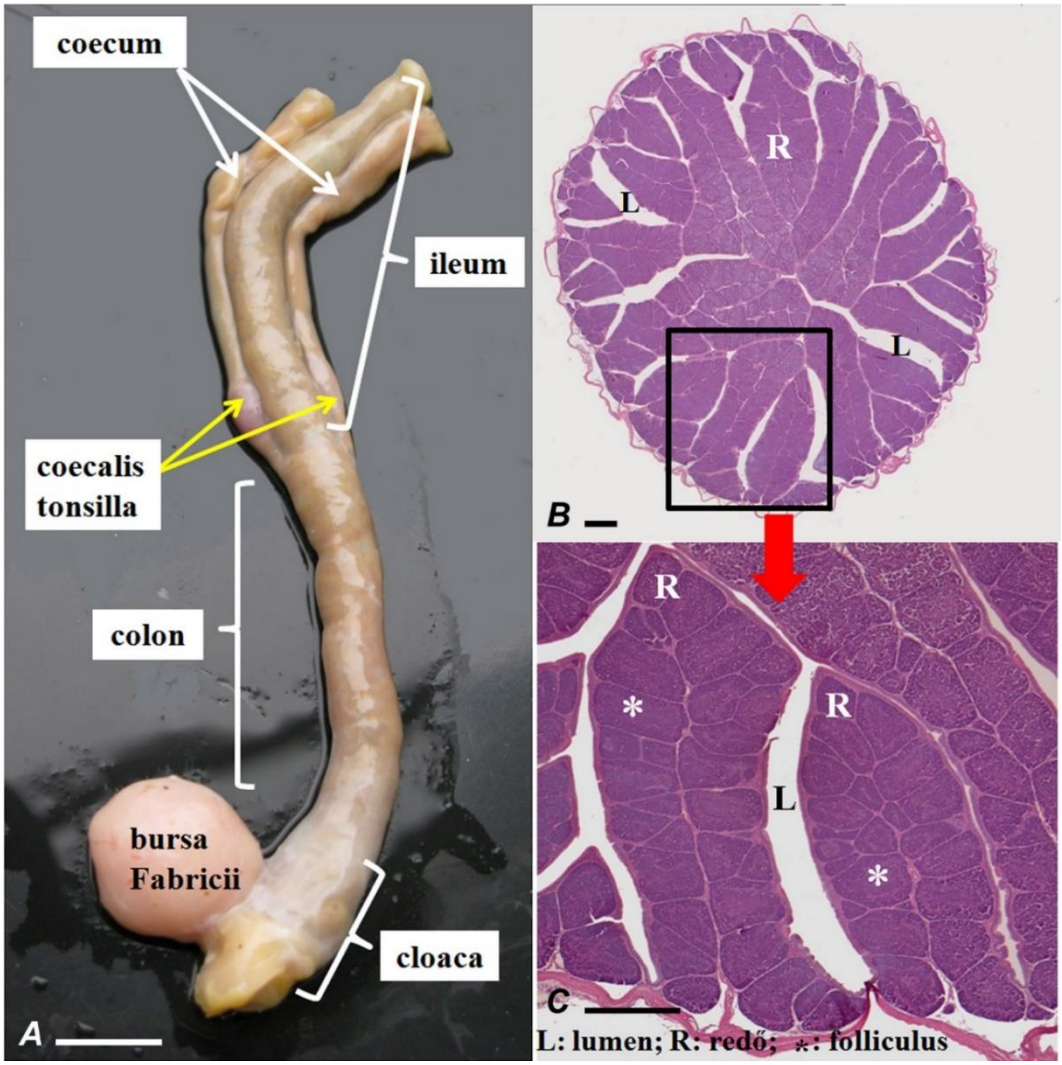
A bursa Fabricii a madarakra jellemző primer nyirokszerv, amely kritikus szerepet játszik a B lymphocyták fejlődésében, differenciálódásában és szelekciójában. A bursa Fabricii humorális immunitás kialakításában betöltött szerepét Bruce Glick ismerte fel először. 1956-ban számolt be bursectomiás (bursa eltávolítás) kísérleteiről, amelyek alapján arra következtetett, hogy a bursa Fabricii részt vesz az antigén-specifikus ellenanyagok termelésében (Glick et al., 1956). Nem sokkal később Warner és Szenberg javaslatára a thymus és a bursa különböző hatásmechanizmusa alapján, a csirke immunrendszerét funkcionálisan két részre különítették (Warner & Szenberg, 1962). Ez vezetett az immunitás disszociációs elméletének megszületéséhez, miszerint a sejtközvetített immunválaszt a T (thymus eredetű) lymphocyták, az ellenanyag közvetítette immunválaszt pedig a B (bursa eredetű) lymphocyták végzik (Cooper et al., 1965; Gitlin & Nussenzweig, 2015). Ezután kezdték el meghatározni emlősökben az úgynevezett bursa–equivalens szerveket, amelyek közé a juh ileális Peyer-plakkjai, a nyúl appendix vermiformise, emberben és a többi emlősben a csontvelő tartozik (Reynaud et al., 1991; Weinstein et al., 1994). A csontvelőben, appendixben és a Peyer-plakkokban hasonló celluláris és molekuláris mechanizmusok zajlanak, amelyek elengedhetetlenek a B lymphocyták korai fejlődéséhez, viszont ezekben a szervekben az egyéb lympho-myeloid sejtvonalak fejlődése és differenciációja is zajlik. A bursa Fabricii egyedülálló módon, a többi lympho-myeloid sejtvonal fejlődésétől függetlenül biztosít megfelelő mikrokörnyezetet a B lymphocyták fejlődéséhez (Glick, 1994). Ezért is válhatott a B sejt fejlődésre irányuló biológiai kutatások egyik legjobban tanulmányozott modellévé.

2.1.2. A bursa Fabricii általános felépítése

A bursa Fabricii kifejlett csirkében 1,5-1,7 cm átmérőjű, redőket tartalmazó üreges szerv, amely kivezető csövén keresztül a kloáka proctodeumával (1. ábra A)

állandó összeköttetésben van (Boyden, 1922; Oláh et al., 1986; Nagy et al., 2022). Kívülről zsírsejtekben gazdag tunica adventitia borítja. Falát belső körkörös és külső hosszanti simaizomréteg alkotja, amely összefügg a kloáka izomrétegével.

A bursa lumene harántmetszeti képen csillag alakú, az üregébe bedomborodó 12-16 hosszanti lefutású redő miatt (1. ábra B). Az egyes redők 5-7 mm magasak, 2-3 mm szélesek és 12-15 mm hosszúak. Ezt a méretet 4-6 hetes korú csirkében lehet megfigyelni, amikorra a bursa gyors növekedése (a testsúly gyarapodásához viszonyítva) befejeződik (Oláh és Glick, 1978a). A redők kötőszövetébe nagyszámú, B lymphocytákkal teli follikulus ágyazódik (1. ábra C), amelyek a bursa Fabricii funkcionális és szerkezeti alapegységei (Sayegh et al., 2000).



1. ábra: *A bursa Fabricii anatómiája és általános szövettani szerkezete.* **A)** A bursa Fabricii a vastagbél dorsalis oldalán, a kloáka proctodeum részéhez csatlakozva található. **B)** A bursa kis nagyítású, hematoxilin-eosin festett keresztmetszeti képén hámsejtekkel borított redők (R)

figyelhetőek meg. A bursa üregébe domborodó redők miatt a lumen (L) csillag alakú. **C**) A bursa redőit (R) lymphoid follikulusok (*) töltik ki. Bar: A: 10000 µm; B és C: 1000 µm. *Saját készítésű képek.*

A follikulusok elhelyezkedése szabályos, a redők kötőszövetes tengelyében húzódó erek (artériák, vénák, nyirokerek) két oldalán, a lument bélelő epitheliumhoz asszociáltan lokalizálódnak. Felnőtt állatokban nagyobb terjedelmű centrális velőállományból és keskenyebb marginális, kéregállományból épülnek fel (Nagy et al., 2022). Ez a szerkezeti felépítés a kikelést követő hetekben válik teljessé, mivel az embrionálisan megjelenő hámbimbók a felnőttkori follikulusok velőállományának feleltethetők meg, és a kéregállomány differenciálódása közvetlenül a kikelés előtt néhány nappal kezdődik. A bursa Fabricii nem állandó szerve a madarak szervezetének, körülbelül 23 hetes korra teljesen visszafejlődik (Naukkarinen & Sorvari, 1984).

2.1.3. A bursa Fabricii follikulusainak szöveti szerkezete

A bursa Fabricii közvetlen összeköttetése a bélrendszerrel lehetővé teszi a külső, idegen antigének bejutását a bursa lumenébe, amelyek a felszínt borító epithelium közvetítése révén befolyásolják a follikulusok B lymphocytáinak érését (Felföldi et al., 2005). A kikelést követően a bursa redők felszíni hámborításának mintegy 90%-át az úgynevezett interfollikuláris epithelium (IFE) adja (2. ábra A, B, E), amely basalis membránon ülő, szekréciós hengerhámsejtekből és differenciálatlan, a felszínt el nem érő, basalis sejtekből áll (Romano et al., 1996; Kaiser & Balic, 2015; Bódi et al., 2018). Elektronmikroszkópos felvételek alapján ismert, hogy a szekréciós hengerhámsejtek apikális felszíne mikrobolyhokkal tagolt és nagyszámú mucint tartalmazó granulum lokalizálódik bennük. Mindemellett lizozimet (Balic et al., 2019) és egyéb antimikrobiális anyagokat, például katelicidin-B1 peptidet (Goitsuka et al., 2007) is termelnek, megfelelő a felszíni hámot védő barriert képezve a bursa lumenébe kerülő mikroorganizmusokkal szemben.

A hámfelszín maradék 10%-át a follikulus-asszociált epithelium (FAE) alkotja (2. ábra A, B, D). A FAE sejtjei szigetszerűen ékelődnek be az IFE sejtjei közé, specifikus összeköttetést biztosítva a follikulusok velőállománya és a bursa lumene között (2. ábra A, B, D). Morfológiáját tekintve a FAE-t egyrétegű, piramis alakú sejtek alkotják széles apikális és elkeskenyedő basalis résszel. Apikálisan ritkábban álló mikrobolyhokat

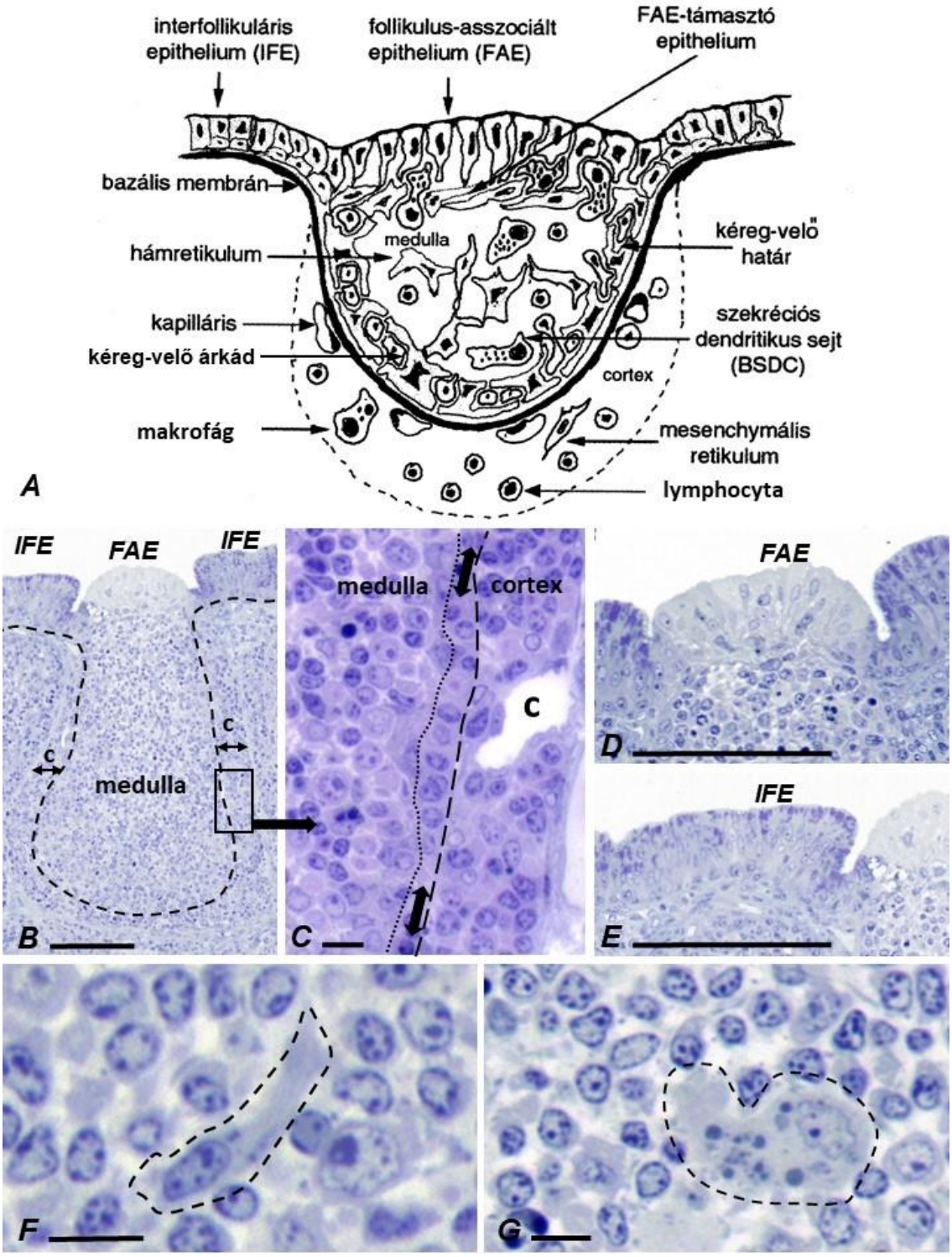
hordoznak, a szomszédos sejtek pedig zonula occludensekkel kapcsolódnak egymáshoz (Nagy et al., 2001). Ellentétben az IFE sejtjeivel mucint és antimikrobiális anyagokat nem termelnek továbbá morfológiailag egyedülálló jellegzetességük, hogy nincs alattuk alaphártya. Alátámasztásukat az alattuk 3-5 sejtsorban elhelyezkedő ellaposodott hámsejtek (ún. FAE-támasztó epithelium sejtjei) végzik, amelyek desmosomákon keresztül kapcsolódnak a velőállomány hámretikulumához (Nagy et al., 2001; Nagy et al., 2004a). Az emlősökben jól ismert Microfold (M) sejtekkel funkcionálisan analóg FAE sejtek biztosítják a follikulus velőállománya és a bursa lumene közötti anyagforgalmat (Bockman et al., 1983; Balic et al., 2019). A FAE sejtjei a lumenből antigéneket kötnek meg, (bél eredetű antigének a kloáka felől retrográd perisztaltikával kerülnek ide), amelyeket transzcitózissal továbbítanak a follikulus velőállományába (Sayegh et al., 2000).

Antimikrobiális anyagok hiányában a mikroorganizmusok átjutása szintén a FAE sejtjein keresztül lehetséges. Feltételezések szerint a felvett antigének a B lymphocyták érésének irányításában vesznek részt, valószínűleg a bursai szekréciós dendritikus sejtek (BSDC) közvetítésével (lásd később). A FAE sejtek szoros kapcsolatban vannak a velőállományi elhelyezkedő antigén prezentációt is végző makrofágokkal. Kifejezetten a TIM4+ (apoptotikus sejtek felvételében résztvevő foszfatidilszerin receptor) makrofágok azok, amelyek a FAE sejtek basolateralis részei közé ékelődve lokalizálódnak, habár ennek a kapcsolatnak a pontos funkciója nem ismert (Balic et al., 2019).

A bursai follikulusokban előforduló harmadik hámtípus a velőállomány vázát alkotó cytokeratin+/E-cadherin+ retikuláris hám, amely ectodermalis eredetű, a bursa lumenét bélelő hengerhámból differenciálódik a follikulus bimbók fejlődése során (Nagy & Oláh, 2010). A sejtek nyúlványosak, csillag alakúak, egymáshoz desmosomákon keresztül kapcsolódva háromdimenziós hámretikulum hálózatot hoznak létre (2. ábra A). A velőállomány szélén lokalizálódó hámretikulum sejtek nyúlványokkal nem rendelkeznek, ellaposodottak, alattuk alaphártya található, amely folytonos a felszíni IFE alaphártyájával (2. ábra A, C). Ezek a sejtek képezik a kéreg- és velőállományt elválasztó ún. cortico-medulláris hámsejt réteget (cortico-medullary epithelium = CME) (2. ábra C). A cortico-medulláris hámsejtek a velőállomány felé néző, jellegzetes árkádszerű képleteket formálnak (cortico-medullary epithelial arches = CMEA) (2. ábra A), amelyek ritkán osztódó, nem B sejt progenitorokat (CD45+/chB6-), hanem feltehetőleg a

dendritikus sejtek progenitorait zárják közre (Oláh et al., 2022). A cortico-medulláris hámsejtek rétege barrierként funkcionál a follikulusokon belül, amelyen keresztül szabályozott, intenzív lymphocyta migráció zajlik a velő- és kéregállomány között (Nagy et al., 2004a; Oláh et al., 2002) (2. ábra C).

A bursa Fabricii egy másik jellegzetes sejttípusát, a szekréciós dendritikus sejteket (bursal secretory dendritic cell, BSDC), amelyek kizárólagosan a follikulusok velőállományában lokalizálódnak, először Oláh és Glick írta le (Oláh & Glick, 1978b) (2. ábra A, F). Ultrastruktúrájuk némileg eltér az emlősöknél leírt dendritikus sejtekétől. A szekréciós dendritikus sejtek általában hosszan elnyúltak, két aszimmetrikus nyúlvánnyal rendelkeznek, citoplazmatikus organellumaik elhelyezkedése nem egyenletes, polarizáltságot kölcsönöz a sejteknek. Az egyik nyúlvány fejlett durva felszínű endoplazmás retikulumot, Golgi-apparátust, és nagyszámú granulumot tartalmaz. A másik sejtnyúlványt főleg intermedier filamentumok töltik ki, granulumokat nem tartalmaz, citoplazmatikus organellumokban szegény. Az intermedier filamentumokat vimentin képezi (Oláh et al., 1992), hasonlóan más dendritikus sejtekhez, illetve a bőr Langerhans sejtjeihez. Nevüket szekréciós tevékenységükről kapták, amelyre a sejtek felszínén membránhoz kötötten megjelenő, sűrű elektrondenz anyag utal (Oláh és Glick, 1987). Ennek mennyisége a granulumok számával arányosan változik. A BSDC-k eredetüket tekintve, a follikulusokat indukáló, CD45+ hematopoietikus eredetű sötét sejtekből differenciálódnak és a vimentin mellett N1C2 és 74.3 antigéneket is expresszálnak (Nagy et al., 2004a, 2004b). Legújabb kutatások kimutatták, hogy a csirke BSDC sejtjei további, emlősökben is leírt sejtfelszíni molekulákat is expresszálnak mint például: CD83 protein (Lee et al., 2012), DEC205 receptor (CD205; Staines et al., 2013), CD11c (Oláh & Nagy, 2013; Nagy et al., 2016), kolónia stimuláló faktor 1 receptor (CSF1R; Balic et al., 2019). A kikelést követően a sejteket felszíni IgG és MHCII pozitivitás is jellemzi. Fehérjéik szintézisének vizsgálatai során kiderült, hogy ezen sejtek az IgG-t nem termelik, csupán felszínükön megkötik (Felföldi et al., 2005). A bursa Fabricii lumenéből az antigének a FAE közvetítésével a follikulusok velőállományába jutnak, amelyeket a BSDC-k felszínükön megkötött immunkomplexek formájában prezentálnak, elősegítve ezzel a B lymphocyták érési folyamatait. A BSDC-k szövet specifikusan, önfenntartó sejtpopulációt képeznek. Prekurzor sejtjeik feltehetően a



2. ábra: *A bursa Fabricii follikulusainak szövettani szerkezete.* **A)** A bursai folliculus sémás rajza. **B-G)** Félvékony metszetek toluidinkék festéssel. **B)** Bursa follikulus átnézeti képe: felszíni epithelium alatt húzódó basalis membrán (szaggatott vonal) folytonos a kéregállományt (c) és medullát elválasztó epithel réteg alatti basalis membránnal. Follikulus asszociált epithelium

(FAE), interfollikularis epithelium (IFE). Körbe rajzolt terület a C képen kinagyítva. **C)** A kéreg- (cortex) és velőállományt (medulla) egymástól elválasztó epithel réteg (↔), mely alatt folytonos basalis membrán (szaggatott vonal) található. Cortico-medullaris epithel réteg apikális felszíne (pontozott vonal). Kéregállományi kapilláris (c). **D)** Mucint nem szekretáló FAE. **E)** Mucint szekretáló IFE. F) Szaggatott vonallal körül határolt szekréciós dendritikus sejt. **G)** Szaggatott vonallal körül határolt velőállományi makrofág. Bar: B, D, E: 100 µm; C, G: 10 µm. *A) Sémás rajz forrása: Nagy és munkatársai ábrája módosítva (Nagy et al., 2001. Figure 1.). B-G) saját készítésű képek.*

cortico-medullaris árkádokban lokalizálódnak, szükség esetén a velőállományába kikerülve antigén prezentáló sejtekké differenciálódnak. A terminálisan differenciálódott BSDC-k nemcsak antigén prezentáló, hanem fagocitózisra képes makrofág-szerű sejtekké alakulnak (Nagy et al., 2016; Oláh et al., 2022).

A bursa Fabricii velőállományának felépítésében a hámretikulum, a dendritikus sejtek és a B lymphocyták mellett kis számú makrofág is részt vesz (2. ábra A, G). A velőállomány makrofág populációja kimutatható a kifejezetten csirke monocyta-makrofág sejtjeit specifikusan jelölő KUL01 ellenanyaggal (Mast et al., 1998) a Lamp1 fehérjét Lep100 (Lippincott-Schwartz & Fambrough, 1987), illetve a foszfatidilszerin receptort jelölő TIM4 (Balic et al., 2019) ellenanyagokkal is.

A felnőtt állatok follikulusainak kéregállománya, a velőállomány hámretikulumával ellentétben, mesenchymából származó retikulum sejtekből (MRC=mesenchymal reicular cell) áll, amelyek desmint és vimentint expresszálnak (Oláh & Glick, 1995). A kéregállomány a fejlődés során később jelenik meg, a kikelés után két héttel éri el kifejlett állapotát (Igyártó et al., 2008). A mesenchymális retikulum sejtek által létrehozott háromdimenziós struktúra lazább szerkezetű, mint a velőállomány hámeredetű retikuláris sejtjeinek hálózata (Madej et al., 2013), mindemellett sok extracelluláris mátrix molekula, például kollagén I, kollagén III, fibronektin és tenascin-C jellemzi (Oláh et al., 2014). A lymphocyták elszállításában résztvevő kapillárisok gazdag hálózata kifejezetten a kéregállományra jellemző, a velőállomány nem vaszkularizált (Abbate et al., 2007) (2. ábra A, B). Nyirokkapillárisok sem a kéreg sem a velőállomány területén nem találhatók, csakis a follikulusok közötti kötőszövetes térben figyelhetőek meg, viszont a kéregállomány külső szegmenséből a nyirokerekbe átlépő lymphocytákat sikerült azonosítani (Ekino et al., 1979). A kéregállomány sűrűn elhelyezkedő B lymphocytái mellett, elszórtan T lymphocytákat, makrofágokat (Balic et al., 2019; Oláh et al., 2022) és granulocytákat is tartalmazhat (Kim et al., 2000)

2.1.4. A bursa Fabricii embrionális fejlődése

A bursa Fabricii fejlődésére számos irodalmi adatot találunk (Oláh et al., 1992; Nagy et al., 2001; Nagy et al., 2004a, 2004b; Nagy & Oláh, 2010). A legtöbb tanulmányt csirke embrión végezték, de néhány irodalmi adatot már ismerünk egyéb fajokra, például gyöngytyúk és fürj embriókra vonatkozóan is (Nagy et al., 2001; Nagy et al., 2004a). A gyöngytyúkok tojásból való kikelése a csirkékhez képest 5-6 nappal később (26-27 napra) történik. Ez a pár nap eltolódás megjelenik a bursa Fabricii hisztológiai fejlődésében is, habár a folyamat lépései teljesen azonosak a csirkében leírtakkal (1. táblázat). Mivel a gyöngytyúkok bursájának fejlődéséről kevesebb irodalmi adatot ismerünk, ezért a továbbiakban a bursa fejlődésére megadott időpontok csirkére vonatkoznak (Glick, 1988).

1. táblázat: Jellegzetes fejlődési stádiumok a bursa Fabricii ontogenezise során, gyöngytyúk és csirke embrióban.

Főbb stádiumok	**gyöngytyúk**	**csirke**
Bursa epithelialis telepének a megjelenése	7 E[1]	5 E[4]
Dendritikus prekurzor sejtek megjelenése a mesenchymában	12 E[1]	9 E[4]
Redők képződésének időpontja	14 E[1]	10 E[4]
Follikulus bimbók indukciója	16 E[1]	11-12 E[4]
chB6 pozitív B sejtek megjelenése a follikulus bimbókban	16-17 E[2]	12-13 E[5]
Follikulus asszociált epithel sejtek megjelenése	22E[1]	15E[3]

[1]Nagy et al., 2001
[2]Saját megfigyelés alapján
[3]Madej et al., 2013
[4]Oláh et al., 1986
[5]Glick, 1994
E: embrionális nap

A bursa Fabricii embrionális fejlődése különböző stádiumokra tagolható. Első lépésként a **szerv epithelio-mesenchymális telepe jelenik meg.** Csirkében az embrionális fejlődés 5. napján a kloákalemez vezikulumszerű megnagyobbodása figyelhető meg a proctodeum és az urodeum határán, amely hámcsap formájában kezd belenőni a farokbimbó mesenchymájába (Nagy & Oláh, 2010). A bursa lumenének

kialakulása az embrionális fejlődés 5-7. napján történik, a hámcsap belsejében zajló intenzív apoptózis révén. Az elpusztult sejtek helyén vakuolumok keletkeznek, majd ezek összenyílásával hámsejtekkel bélelt üreg képződik (Oláh et al., 1986). A bursa epithelialis kezdeményének ectodermális eredetét embriómanipulációs kísérletek alapján sikerült bizonyítani (Nagy & Oláh, 2010). A mesenchyma sejtek intenzív proliferációja miatt, a 10. naptól kezdve már megjelennek a bursa lumenébe domborodó, hámmal fedett redők.

A bursa fejlődésének következő fő eseménye **a follikulus kezdemények indukciója** (3. ábra A), amely egybeesik a bursa telepének hematopoietikus eredetű CD45+ sejtek általi kolonizációjával (Le Douarin et al., 1975; Oláh et al., 1986; Nagy et al., 2004b; Fellah et al., 2014; Dóra et al., 2017). A bursa Fabricii prekurzor sejtek általi kolonizációja három hullámban, a 8-15. embrionális napok (E) között történik (Nagy et al., 2004b). Az első hullámban Grl1+/Grl2+ granulocyta vonalhoz tartozó sejtek jelennek meg a bursa mesenchymájában (Quesada & Agulleiro, 1984; Thomas et al., 1993; Nagy et al., 2020). Ez a sejtpopuláció átmenetileg van jelen a fejlődő szervtelep redőinek tengelyében, 17. embrionális napra számuk jelentősen csökken és még a kikelés előtt teljesen eltűnik. A második hullámban myeloid prekurzor sejtek bevándorlása történik a 9. embrionális naptól. E9-E15 közötti napokban a fejlődő bursa hám alatti mesenchymájában, két jellegzetes sejttípust különíthetünk el: a világos mesenchyma sejteket és az orsó alakú, vérkeringésből származó, ún. sötét sejteket. A sötét sejtek (amelyek a BSDC prekurzorai) elnevezésüket toluidinkékkel festett félvékony metszeten adott, erős basophil festődésükről kapták. A sötét sejtek csirkében a CD45 (közös leukocyta antigén) és 74.3 (csirke dendritikus sejt marker) antigéneket fejezik ki (Nagy et al., 2004b; Nagy & Oláh, 2010), míg gyöngytyúkban és fürjben, QH1 (hematopoietikus sejt és endothel marker) és N1C2 (dendritikus sejt marker) antigéneket expresszálnak (Nagy et al., 2001). A 10. embrionális napon, közvetlenül a bursa lumenét bélelő hám alatti mesenchymában a CD45+/74.3+ sötét sejtek kis csoportokat alkotnak, majd a 11-12. napon átlépik a hámréteg alaphártyáját és a hámsejtek közé vándorolnak (Lupetti et al., 1986; Oláh et al., 1986). Belépésük helyén a hámsejtek intenzív osztódásba kezdenek, a mesenchyma irányába bimbóznak, miközben az alaphártyát maguk előtt tolva, kezdetét veszi a leendő follikulusok kialakulása (3. ábra A, B). A fejlődő hámbimbók a felnőtt bursai follikulusok velőállomány kezdeményeinek tekinthetők, és csak azokon a helyeken képződnek, ahol a CD45+/74.3+ sejtek a hámba vándoroltak (Nagy et al., 2001). A

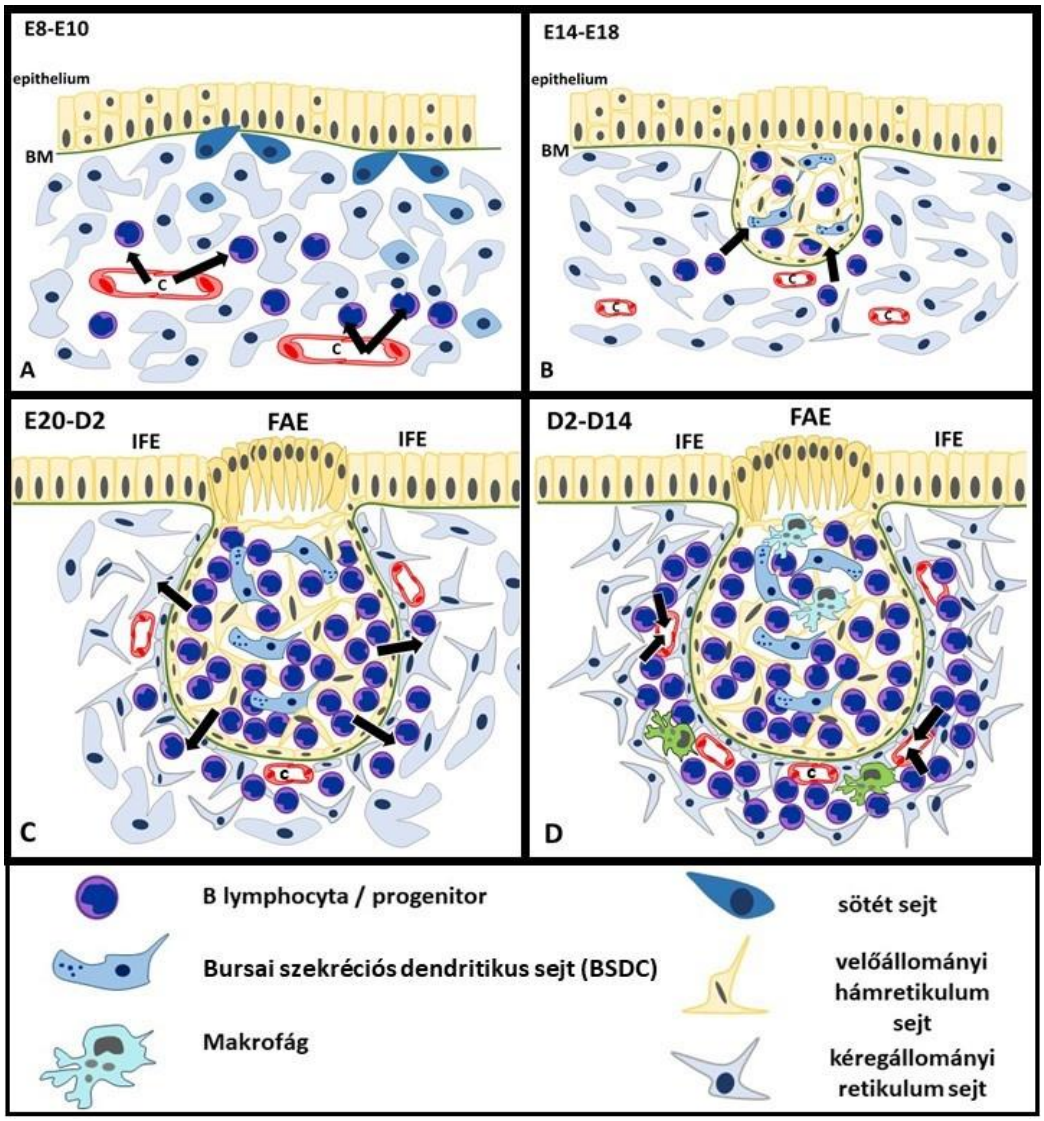
későbbiekben a follikulus indukciót elindító sötét sejtekből differenciálódnak a velőállomány CD45+/74.3+/CSF1R+/MHCII+ szekréciós dendritikus sejtjei (Nagy et al., 2004a, b; Nagy & Oláh, 2010). Így alakul ki a fejlődő follikulus bimbó alapját képező dendro-epithelialis szövet. A világos sejtek a mesenchymában maradnak és a későbbiekben feltehetően a kéregállomány retikuláris sejtjeit hozzák létre (Nagy et al., 2004a).

Végül (harmadik sejtpopulációként) lymphoid prekurzorok kolonizálják a fejlődő bursa telepét (Nagy et al., 2004b). A bursát kolonizáló B sejt prekurzorok először a redők mesenchymájába lépnek, majd a felszíni hám irányába vándorolnak. Ezt követően az embrionális élet 12-15. napja között, indul meg a bursa Fabricii fejlődésének harmadik stádiuma: **a follikulus bimbók B sejtes kolonizációja** (3. ábra B), amely során egy-egy fejlődő follikulus bimbóba mindössze 2-3 B lymphocyta prekurzor sejt lép be (Pink et al., 1985; Ratcliffe, 2006). A tömör dendro-epithelialis szövet sejtjei között megtelepedve és azokkal szoros kontaktusba kerülve, a B sejtek intenzív osztódásba kezdenek, amelynek következményeként a hámsejtek fokozatosan nyúlványossá, csillag alakúvá válnak, retikulum sejtekké differenciálódnak. A B lymphocyta prekurzorokban az immunglobulin gének átrendeződése még a bursa Fabricii-be történő belépésüket megelőzően megindul és azok a lymphocyták, amelyek nem képesek felszíni immunglobulin expressziójára, apoptotizálnak. A madarak diverz immunglobulin repertoárja génkonverziós folyamatok hatására alakul ki, amely kifejezetten a follikulusok állományán belül zajlik. Habár a folyamat nem teljesen tisztázott, a génkonverzióhoz szükséges stromális mikrokörnyezet kialakításában és a folyamatot szabályozó mechanizmusokban fontos szerepet tulajdonítanak a BSDC sejteknek (Nagy et al., 2004a, 2004b; Ratcliffe, 2006; Oláh & Nagy, 2013).

A bursa fejlődése során a negyedik jellegzetes morfológiai változás **a follikulus asszociált epithelium (FAE) megjelenése** (3. ábra C), amely az embrionális fejlődés utolsó hetén történik, a növekvő follikulus kezdemény lympho-epitheliális egysége fölött (Dolfi et al., 1988; Nagy et al., 2001; Madej et al., 2013). Ez a speciális hám nem rendelkezik basalis membránnal, mert a follikulusbimbók növekedése során az eredetileg felszíni epitheliális sejtek a mesenchyma fele tolódnak az alattuk elhelyezkedő alaphártyával együtt, ami végül a kifejlett follikulus kéreg-velő határvonalát fogja képezni. A FAE kapcsolatot teremt a follikulus velőállománya és a bursa lumene között,

kiemelt szerepet betöltve a különböző antigének follikulus belsejébe történő transcytózisában.

A bursa Fabricii fejlődése nem áll meg a kikelést követően, mivel **a follikulusok kéregállományának kialakulása** (3. ábra C, D) még zajlik (Nagy & Oláh, 2010.) A bursai follikulusok kéregállományának embrionális fejlődéséről, differenciálódásáról csak kevés információval rendelkezünk. Feltételezik, hogy kialakulása a kikelés környékén veszi kezdetét azáltal, hogy B lymphocyták a velőállományból, a kéreg-velő határ hámsejtjeinek alaphártyáján áthatolva, kilépnek a mesenchyma sejtek közé (Sayegh et al., 2000). Teljesen kifejlett állapotát kikelés után két héttel éri el (Igyártó et al., 2008).



3. ábra: *Sémás ábra; a bursa Fabricii follikulogenezisének fő lépései*. **A)** A felszíni epithelium basalis membránját (BM) átlépő véreredetű sötét sejtek (dendritikus prekurzor sejtek) indukálják a follikulusok kialakulását. Közben a bursa telep mesenchymájába belépnek az első prebursalis

B lymphocyták. **B)** A kialakuló dendro-epithelialis szövetet néhány B lymphocyta progenitor kolonizálja, melyek intenzív osztódásba kezdenek, miközben kialakul a leendő velőállomány hámretikulum hálózata. **C)** Kikelést megelőzően megjelenik a leendő velőállományt a lumennel összekötő FAE sejtjei. Párhuzamosan a B lymphocyták átlépik a leendő kéreg-velő határ hámsejt réteg basalis membránját (BM), megkezdve a follikulusok kéregállományának kialakítását. **D)** A kifejlett follikulusok B lymphocytái a kéregállományi kapilláris (c) hálózaton keresztül lépnek ki a perifériás keringésbe. A nyilak (↑) a B lymphocyták migrációjának irányát jelzik; E: embrionális nap; D: kikelést követő nap; IFE: interfollikuláris epithelium, FAE: follikulus asszociált epithelium. *Saját készítésű ábra.*

2.2. A madarak B lymphocytáinak fejlődése

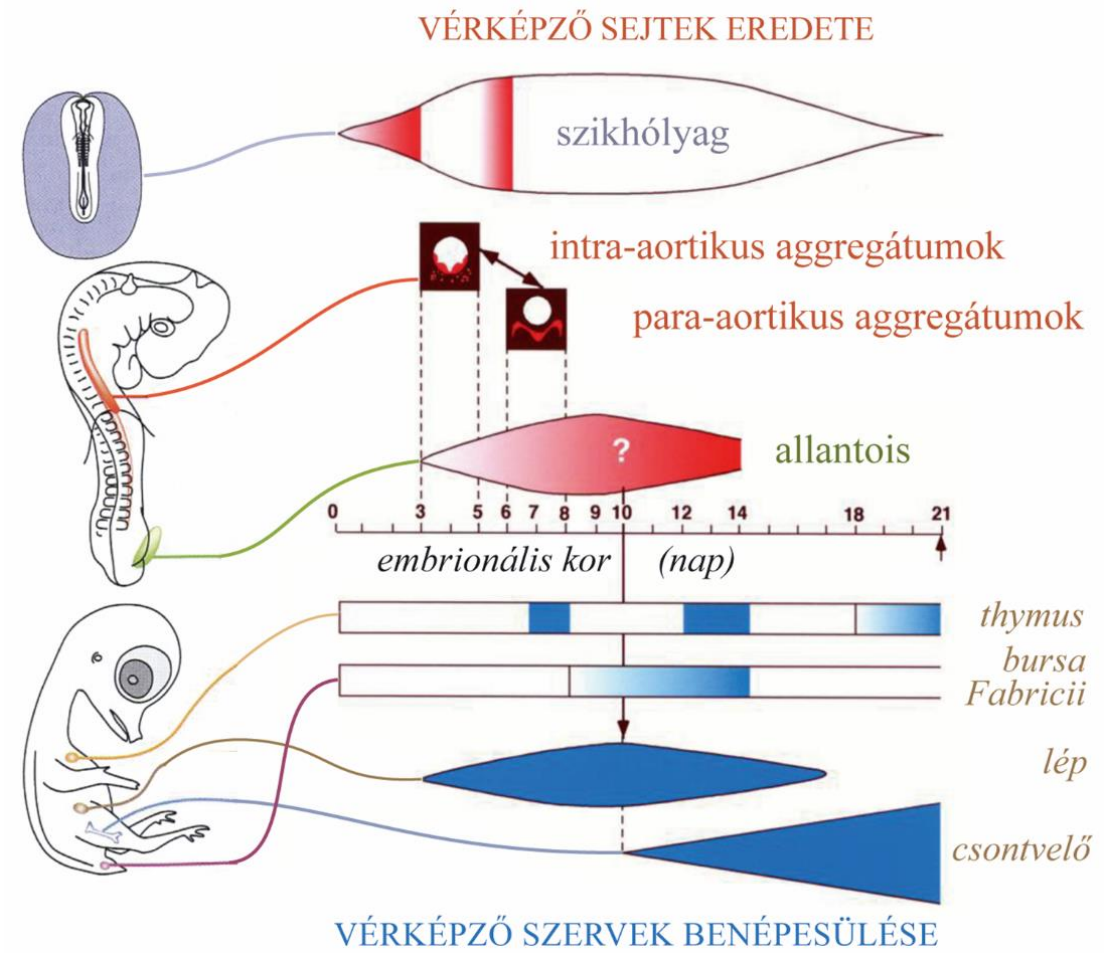
2.2.1. A B lymphocyta progenitorok determinációja, érési lépései

A madár embrió lympho-myeloid szerveit (bursa Fabricii, thymus, lép, csontvelő) különböző időpontokban vérképző, más néven hematopoietikus őssejtek (hematopoietic stem cell, HSC) kolonizálják (4. ábra). Ezen multipotens sejtek képesek mind a négy vérsejtvonal (erythroid, thromboid, myeloid és lymphoid) populációinak létrehozására. A madarak fejlődése során az első HSC-k extraembrionálisan a szikhólyag vérszigeteiben mutathatóak ki, amelyek átmenetileg, mint primitív vérképző őssejtek vesznek részt a korai vérsejtalakok létrehozásában (Lacaud et al., 2017; Nagai et al., 2018). A 2000-es évek kezdetén főleg *in situ* hibridizációs, illetve sejtfelszíni expressziós mintázat vizsgálatain alapuló technikákkal a szikhólyagi HSC-k erythroid és thromboid sejtvonal irányú elköteleződését sikerült alátámasztani (McNagny et al., 1997; Mink et al., 2003; Nakazawa et al., 2006). A későbbi években transzgénikus állatmodellek és kiméra kísérletek alkalmazásával a myeloid sejtvonalhoz tartozó makrofágok (Garceau et al., 2015), BSDC progenitor sejtek (Dóra et al., 2017) illetve cirkuláló endothel sejtek (Pardanaud & Eichmann, 2011; Seco et al., 2020) szikhólyag eredetű, extraembrionális kialakulását is igazolták. Ezeket a sejteket erythro-myeloid progenitoroknak (EMP) nevezték el (Wu & Hirschi, 2021).

Az 1970-es években Dieterlen-Lièvre és munkatársai csirke-fürj kiméra segítségével mutatták ki először kísérletesen, hogy a későbbi felnőtt vérképzésben szerepet játszó úgynevezett definitív HSC-k intra-embrionálisan keletkeznek (Dieterlen-Lievre, 1975). Ezt az eredményt egér kísérleti modellben is sikerült alátámasztani (Delassus & Cumano, 1996).

Madarakban az intra-embrionális vérképző őssejtek három jól definiálható helyen mutathatóak ki; a dorsalis aorta ventralis fala mentén megfigyelhető intra-aortikus hematopoietikus klaszterben (E3-E4), az alatta elhelyezkedő para-aortikus régióban (E6-E8) (Jaffredo et al., 2000), valamint a laboratóriumunkban felfedezett arteria coelica körüli mesenchymában, az úgynevezett periarteriális hematopoietikus hüvely területén (E8-E10) (Dóra et al., 2017). A vérképzést célzó jelenlegi kutatások a definitív HSC-k legfőbb prekurzor sejtjének, a hemogenikus endotheliumot (hemogenic endothelial cell, HEC) tartják (Dieterlen-Lièvre et al., 2006; Seco et al., 2020; Zhao et al., 2022). Ez a sejtpopuláció több gerinces fajban, jellegzetesen a dorsalis aorta ventrális falában mutatható ki (Medvinsky & Dzierzak, 1996; Jaffredo et al., 1998; Ciau-Uitz et al., 2000; Oberlin et al., 2002; Bertrand et al., 2010; Zhao et al., 2022). Ezek az intra-aortikus hemogenikus endothel sejtek osztódásuk által az aorta lumenébe domborodó, növekvő Runx1 transzkripciós faktor, CD45 és CD41 (integrin alfa 2b lánca) expressziót mutató HSC sejtaggregátumot hoznak létre, amelyet a szakirodalom intra-aortikus hematopoietikus klaszterként (IAHC) definiál (Dieterlen-Lièvre et al., 2006; Jaffredo et al., 2010; Richard et al., 2013; Batsivari et al., 2017). Madarakban az intra-aortikus hematopoietikus klaszter az embrionális fejlődés 3-4 napja között az aorta lumenébe domborodó két ventrolaterális vagy egyetlen ventromediális hosszanti redőként figyelhető meg (4. ábra) (Jaffredo et al., 1998). A CD45+ HSC sejtek leválva az intra-aortikus hematopoietikus klaszter sejtjeiről vagy a keringés által folytatják útjukat vagy elhagyva az aortát belépnek a dorsalis mesenteriumba, ahol létrehozzák a para-aortikus hematopoietikus régiót (Jaffredo et al., 2000; Jaffredo & Yvernogeau, 2014; Dóra et al., 2017; Yvernogeau et al., 2022). A lymphoid szerveket kolonizálni képes CD45+/CD44+ progenitor sejtek az 5-6. embrionális napon a para-aortikus régióban detektálhatóak (Lassila et al., 1979; Lampisuo et al., 1998; Dunon et al., 1999; Dóra et al., 2017). A para-aortikus régió sejtjein még nem mutathatóak ki a T illetve B lymphocytákra jellemző sejtfelszíni (CD3, valamint IgM és chB6) molekulák (Dóra et al., 2017), viszont génexpressziós mintázat elemzések alátámasztják az itt lokalizálódó HSC sejtek lymphoid sejtvonal irányú elköteleződését (Säynäjäkangas et al., 2009). Dóra és munkatársai megfigyelték, hogy a 8-9 napos csirke embrió arteria coelica körüli mesenchymában az artériát hüvelyszerűen nagyszámú CD45+ sejt veszi körül

(periarteriális hematopoietikus hüvely), amelyek között E10-es stádiumban elszórtan chB6 immunpozitív sejtet is megfigyeltek (Dóra et al., 2017).



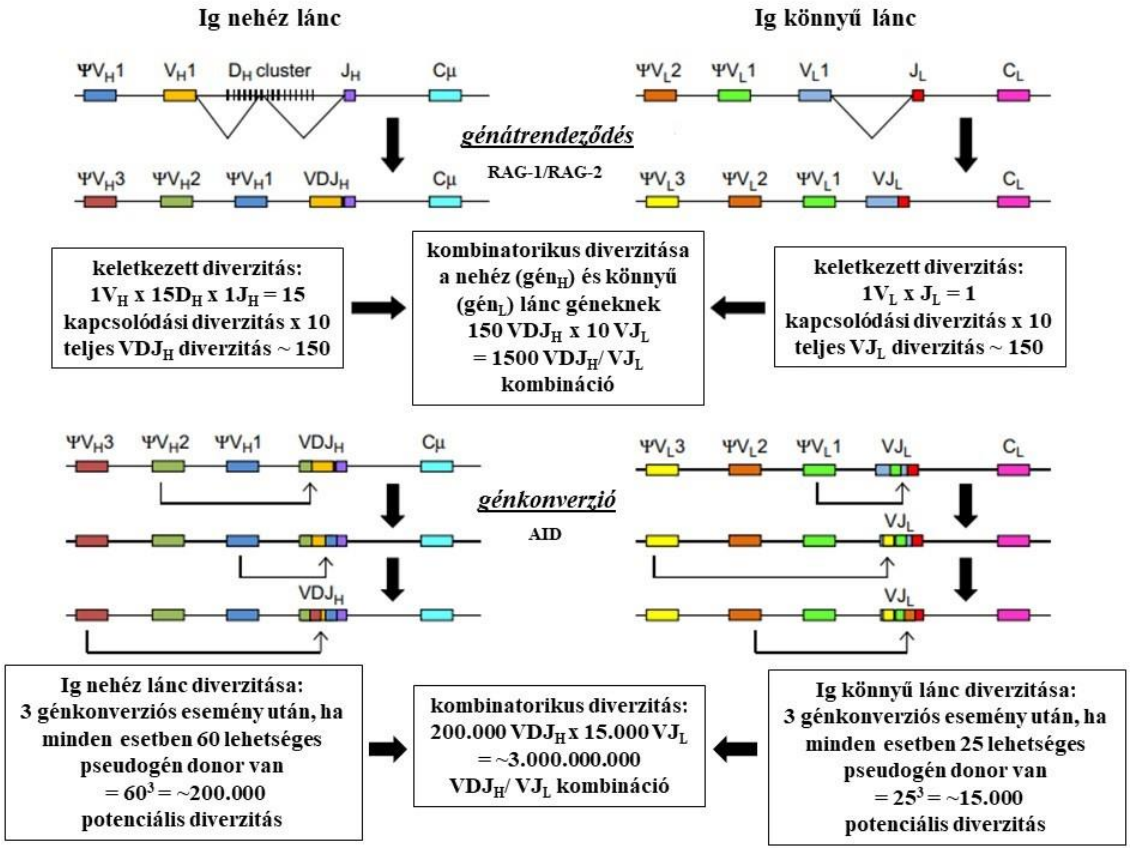
4. ábra: *A vérképző rendszer fejlődése csirke embrióban.* A kép az embrionális kor függvényében ábrázolja a vérképző sejtek keletkezésének a helyét, valamint a különböző lympho-myeloid célszervek kolonizációs időintervallumát. *Ábra forrása: Minkó Krisztina Doktori Disszertációjának 2. ábrája (26. oldal) után módosítva; (Minkó, 2005).*

A B lymphocyták érésének következő szakaszai már a bursa Fabricii fejlődő szervtelepében zajlanak. Az embrionális fejlődés folyamán a bursai follikulusok stromális előtelepét kívülről bevándorló hematopoetikus eredetű sejtek népesítik be (Nagy et al., 2004b; Nagy & Oláh, 2010; Dóra et al., 2017). Hematopoetikus eredetű progenitor sejtek a bursa telepének vaszkularizációja révén jutnak a follikulus bimbók közelébe (Moore & Owen, 1965). A CD45+ hematopoetikus őssejtekből még a bursa kolonizációja előtt Ikaros (korai-B lymphocyta faktor) és Pax5 transzkripciós faktorok hierarchikus sorrendben történő kifejeződése eredményeképpen indul meg a B lymphocyta

progenitorok differenciációja (Lampisuo et al., 1998; Yvernogeau et al., 2019; Yvernogeau et al., 2022).

Sejttranszplantációs és embriómanipulációs vizsgálatok alapján a madarak B lymphocytáinak fejlődése három szakaszra osztható: prebursalis, bursalis és postbursalis szakaszra (Toivanen et al., 1972; Toivanen & Toivanen, 1973; Toivanen et al., 1974). A prebursalis B lymphocyták olyan, a bursa Fabricii mikrokörnyezetétől független módon differenciálódó progenitor sejtek, amelyekben megindul az immunglobulin gének átrendeződése és a chB6 antigén (Bu-1, B lymphocyta marker) expressziója. Az immunglobulin gének átrendeződése a B sejtvonal irányú differenciálódás legelső megnyilvánulása csirkében (Ratcliffe, 2006). A folyamat során a progenitor sejtek DNS-ében az immunglobulin gének szomatikus rekombináción esnek át (5. ábra). Az immunglobulin molekula nehézláncának antigént felismerni képes variábilis (V_H) doménjét három génszegmens kódolja: variábilis (variable; V_H), diverzitás (diverity; D_H) és kapcsolódó (joining; J_H) szegmens. A génátrendeződés első fázisában (E5-6), a lépben, a szikhólyag ereiben és a para-aortikus régióban lokalizálódó progenitor sejtekben megtörténik az immunglobulin nehézláncának variábilis doménjét adó DJ génszegmensek egymás mellé kerülése (Mansikka et al., 1990; Reynaud et al., 1992). Az így kialakult DJ génkomplexhez két nappal később egy V gén is kapcsolódik. A sikeres nehézláncgének átrendeződése megindítja az immunglobulin molekula könnyűlánc variábilis doménjét képező VJ gének átrendeződését. Madarakban – az emlősökhöz hasonlóan – ezeket a génátrendeződési folyamatokat a Rag-1 és Rag-2 rekombináns enzimek szabályozzák (Carlson et al., 1991; Lee et al., 2022). Az emlősökkel ellentétben, a madarak csak egy funkcionális V és J génnel rendelkeznek, így a szomatikus rekombináció csak egy nagyon limitált immunglobulin repertoár létrejöttét teszi lehetővé (Reynaud et al., 1985, 1987). A sikeres génátrendeződés befejeztével a B lymphocyta előalakok IgM-t fejeznek ki, amely a B sejt receptorkomplex (BCR) részeként jelenik meg a sejtfelszínen (Sayegh et al., 2000). A prebursalis szakaszban a B lymphocyták extrabursalis érését az embrionálisan végzett bursectomia kísérletek is alátámasztják; csirke embrión végzett bursectomia után a lymphocyták IgM képzésre képesek, míg antigénspecifikus IgG-t nem termelnek (Cooper, 1969; Mansikka et al., 1990). A prebursalis szakasz a fejlődő bursa mesencymájának chB6+/IgM+ B sejt progenitorok általi kolonizációjával ér véget.

A bursalis szakasz kezdetén a chB6+/IgM+ lymphoid progenitorok a follikulus-bimbókba vándorolnak, ahol intenzív osztódásba kezdenek (Houssaint et al., 1987). A progenitorok osztódásával párhuzamosan a génkonverzió is megtörténik, amely biztosítja a madarak immunglobulinjainak sokféleségét (5. ábra). A génkonverzió alatt az immunglobulin molekula variábilis régióját kódoló egyetlen V génjébe (nehéz- és könnyűlánc esetében is), úgynevezett pszeudo V-gének (rekombinációs szignált nem



5. ábra: *Az ellenanyagok sokféleségének képzési folyamata csirkében.* Az ellenanyagok sokféleségét az immunglobulin molekula nehéz- és könnyű láncának antigént felismerő váriábilis doménje adja. A variábilis domén génátrendeződés és az ezt követő génkonverziós események során alakul ki. Génátrendeződés során a nehéz lánc V_H, D_H és J_H gének, míg könnyű lánc esetében V_L és J_L gének között megy végbe. Csirkében a nehéz lánc esetén egyetlen V_H és J_H gén valamint körülbelül 15 D_H génszegmens található, szintúgy a könnyű lánc esetében egyetlen V_L és J_L gén van. Így a génátrendeződés során kialakuló $V_HD_HJ_H$ és V_LJ_L génkomplexek száma limitált. A csirke immunglobulin molekuáinak sokféléségéért a génkonverziós folyamat felelős, amely során úgynevezett pszeudo-V gének épülnek be (ΨV) nehéz- és könnyűlánc variábilis régióját kódoló egyetlen V génjébe. A könnyű lánc esetében mintegy 25 különböző $ΨV_L$ gén, még a nehéz lánc esetében körülbelül 60 különböző $ΨV_H$ gént azonosítottak. Az ábra becsült érékeket tartalmaz az egyes eseményeket követő ellenanyag sokféleségre. *Ábra forrása: Avian Immunology 2nd Edition 2014. 4 Chapter, Figure 4.1. (67. oldal) módosítva (Ratcliffe & Härtle, 2014).*

tartalmazó V gén) épülnek be. A nehézlánc V génjének 5' végén 60-100, a könnyű láncnak 25 darab pszeudo V-génje van (Reynaud et al., 1987, 1992). A pszeudogének beépülése akár 7-10-szer is megtörténhet egy adott sejt életében megvalósítva a V gének szomatikus diverzifikációját és ezáltal a mintegy 10^7 immunglobulin kialakulását (Thompson, 1992; Masteller & Thompson, 1994). Az átalakult immunglobulin génekkel rendelkező sejtek gyors osztódása (klonális expanziója) mellett az apoptózis mértéke is nő, így kiszelektálódnak a genetikailag hibás, funkcióképtelen vagy a saját antigéneket felismerő receptorokat hordozó B lymphocyták. Az elpusztult sejteket a follikulus bimbókban található makrofágok távolíthatják el (Hu et al., 2019). Mivel a génkonverzió csak a bursa follikulusaiban történik meg, ezért a folyamat során a progenitor sejtek genetikai programját a follikulusok stromális sejtjeinek (BSDC-k, hámretikulum sejtek) közvetlen vagy citokin közvetített hatása irányíthatja (Reynaud et al., 1992). A 2000-es évek elején azonosították az emlős B sejt aktiváló faktor (BAFF) csirke homológját (chBAFF), amely magas expressziós szintet mutat a bursában az embrionális fejlődés 14. napjától kezdve (Schneider et al., 2004). A chBAFF receptora (chBAFFR) kifejeződik valamennyi bursalis B lymphocytán, fontos szerepet játszva a korai B sejtek túlélésének, illetve apoptózisának egyensúlyi fenntartásában (Kothlow et al., 2007). A kikelés előtt néhány nappal a génkonverzión átesett B lymphocyták a velőállományból, a kéreg-velő határ hámsejtjeinek alaphártyáján áthatolva kialakítják a kéregállományt (Sayegh et al., 2000).

A postbursalis fázis a kikelés körül kezdődik és a bursa involúciójáig tart. A naiv bursalis B lymphocyták kivándorolnak a perifériás, kiemelten másodlagos nyirokszervekbe, ahol megtelepedve antigénekkel találkoznak és plazmasejtekké differenciálódnak (Cooper et al., 1969; Paramithiotis & Ratcliffe, 1993). A sejtosztódás során DNS-be beépülő BrdU (5-bróm-2-dezoxiuridin) jelöléssel igazolták, hogy a B lymphocyták közvetlenül a follikulusok kéregállományából lépnek ki a perifériára (Paramithiotis & Ratcliffe, 1994a). Ez a kísérlet azt is felvetette, hogy a fiatal állatok bursájában nap mint nap keletkező B lymphocytáknak csak mintegy 5%-a emigrál a perifériára, a többi valószínűleg apoptózissal elpusztul (Lassila, 1989; Paramithiotis & Ratcliffe, 1994a; Paramithiotis & Ratcliffe, 1994b). A velő- és kéregállományi B lymphocyták között nemcsak a perifériás szervekbe történő kolonizációs képességében, hanem immunfenotípusukban is eltérés mutatkozott. Schusser és munkatársai szerint a

bursából a perifériára történő kivándorlás egyik feltétele az intakt, sejtfelszíni BCR komplex expressziója (Schusser et al., 2013; Schusser et al., 2016). Paramithiotis és Ratcliffe molekuláris hasonlóságot talált az LT2 antigén expressziójában, ahol a bursai follikulusok kéregállományi B lymphocytái és a perifériára kivándorolt B lymphocyták egyaránt expresszálják az LT2 antigént, míg a velőállomány B sejtjei LT2 negatívak (Paramithiotis & Ratcliffe, 1994a). Az LT2 antigén biokémiai tulajdonságai nem ismertek. Houssaint és munkatársai az Ov antigént (más néven: ChL12) határozták meg, mint kérgi B lymphocytákra jellemző molekula (Houssaint et al., 1991). Az Ov antigén kéregállományi B lymphocytákon való expressziója kizárólag áramlási citometriás vizsgálat által igazolt, immuncitokémiai bizonyítása nem történt meg. A különböző fejlettségű, illetve eltérő bursalis lokalizációjú B lymphocytákra specifikus molekulák azonosítása, karakterizálásukra vonatkozó irodalmi adataink hiányosak.

2.2.2. A B lymphocyták migrációját befolyásoló molekulák és a CXCR4/CXCL12 szignalizáció szerepe a B lymphopoiesisben

A B lymphocyták fejlődése során a bursa Fabricii különböző kompartmentjei között intenzív sejtmigráció történik (3. ábra). Első lépésként a prebursalis B lymphocyták kolonizálják a fejlődő bursa telep mesenchymáját (Nagy et al., 2004b; Nagy et al., 2020). Második lépésben néhány B lymphocyta prekurzorok belépnek a fejlődő follikulus bimbó dendro-epitheliális szövetbe, ahol nagyfokú osztódásba kezdenek (Houssaint et al., 1987). Kikelés környékén a bursalis B lymphocyták a follikulus bimbók széli régiójára vándorolva átlépik a cortico-medulláris epitheliumot és az alatta lévő basalis membránt, ezáltal megformálva és létrehozva a follikulusok kéregállományát (Sayegh et al., 2000). A bursai mikrokörnyezet teljes elhagyása a legutolsó lépés, amely során a génátrendeződésen átesett naiv bursalis B lymphocyták a follikulusok kéregállományi kapilláris hálózatán keresztül a perifériára emigrálnak (Paramithiotis & Ratcliffe, 1994a).

A madarak B lymphocytáinak bursa Fabriciin belüli irányított migrációjában résztvevő molekuláris elemek, sejt-sejt, sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatok kevésbé feltártak. Néhány sejtadhézióban résztvevő molekula hatásmechanizmusa viszont jól ismert. A lymphocyták migrációs folyamatának fontos része az érfalon való átlépés, ahol az endothel sejtekhez való kapcsolódásukban fontos szerepet töltenek be a szelektinek

családjába tartozó sejtadhéziós molekulák (Spertini et al., 1991). A szialil LewisX (5-acetilneuraminil-(2-3)-galaktozil-(1-4)-(fukopiranozil-(1-3))-N-acetilglukózamin = CD15s) a szelektinek egy természetesen előforduló ligandja (Varki, 1994), amely jelen van a bursa Fabriciit kolonizáló myeloid és lymphoid prekurzorok sejtfelszínén is. Masteller és munkatársai megfigyelték, hogy a B lymphocyták felszíni glikozilációs állapota befolyással van a bursa telepének kolonizációs folyamatára (Masteller et al., 1995a, 1995b). Kísérletesen igazolták, hogy a szialil LewisX epitóp nélkülözhetetlen a prebursalis B lymphocyták „homingjához", a bursa telep mesenchymájának kolonizációjához (Masteller et al., 1995a). Az embrionális fejlődés 15-17. napja között, a bursalis B lymphocyták glikozilációs fenotípus váltása következik be: a szialil LewisX expressziója egyre csökken és helyette megjelenik a LewisX (3-fokuzil-N-acetillaktózamin, SSEA1: Stage Specific Embryonic Antigen, CD15) molekula. Ez az expressziós mintázat változás kizárólag a bursai mikrokörnyezetben figyelhető meg és szoros korrelációt mutat a B lymphocytákban lezajló génkonverziós eseménnyel (Masteller et al., 1995b). Mindazonáltal a LewisX megjelenése és a szialil LewisX elvesztése egy olyan érési folyamat része, amely során a B lymphocyták elveszítik képességüket a bursába történő belépéshez (Masteller et al., 1995a). A kikelés körüli időszakban egy második glikozilációs állapot változás következik be, a B lymphocyták LewisX expressziója mérséklődik az embrionálisan jelenlévőhöz képest. Ez a második váltás elképzelhető, hogy összefüggésben van a sejtek bursából történő emigrációjával (Masteller et al., 1995b).

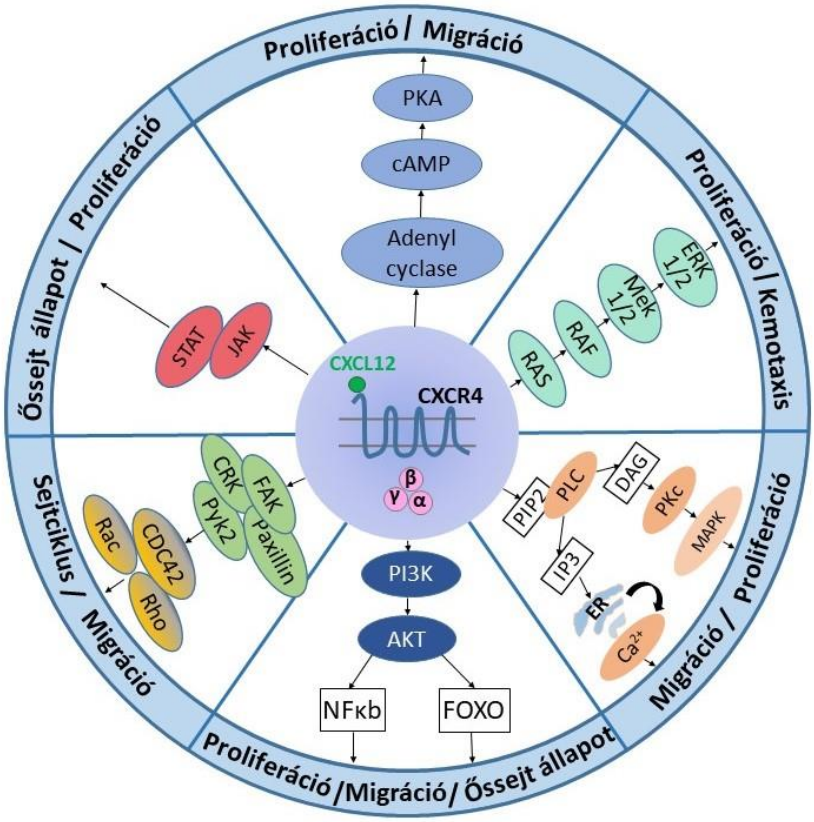
A LewisX molekulán kívül felmerült a HEMCAM sejtadhéziós molekula szerepe a prebursalis B lymphocyták homingjában (Vainio et al., 1996). A HEMCAM egy a csirkében azonosított immunglobulin szupercsaládba tartozó molekula, amely a c-kit pozitív hematopoietikus progenitorok, T lymphocyták, B lymphocyták és vascularis endothel sejtek felszínén is jelen van (Vainio et al., 1996). A HEMCAM homológja az egér és humán CD146/Muc18 molekulának, valamint a patkányban leírt gicerinnek. Mint sejtadhéziós molekula homofil (gicerin-gicerin) illetve heterofil (gicerin-neurite outgrowth factor = NOF) kapcsolat kialakítására is képes (Hayashi & Miki, 1985; Taira et al., 1994). A HEMCAM bekötődését követő szignáltranszdukció hatással van a sejtfelszíni β1 integrin expressziójára, ezáltal képes befolyásolni a lymphoid sejtek migrációs folyamatait (Alais et al., 2001). *In vitro* sejtmigrációs kísérletekben igazolták,

hogy a HEMCAM homológját expresszáló T sejt progenitor, α4β1 integrinjén (VLA-1) keresztüli kapcsolódását segíti az endotheliális vascularis adhéziós molekulákhoz (VCAM-1) (Johnson et al., 1999; Alais et al., 2001). Madarakban a HEMCAM molekula kimutatható a felnőtt bursai follikulusok kéregállományi kapillárishálózatának endothel sejtjein, valamint a kéreg-velő határ menti epithel sejteken. Az embrionális fejlődés során E11-E12 között a legmagasabb a HEMCAM expressziós mértéke a bursa Fabriciin belül, amely egybeesik a prebursalis B lymphocyták kolonizációs folyamatával (Vainio et al., 1996).

A sejtadhéziós mulekulák mellett, a kis molekulatömegű (8-14kDa) kemokinek is jelentős szerepet játszanak a lymphocyta migráció irányításában. Az elmúlt két évtizedben nagy figyelmet kapott a C-X-C kemokin receptor 4 (CXCR4) és ligandja CXCL12 (C-X-C motif chemokine ligand type 12) vagy más néven SDF-1 (stromal derived factor-1), amely emlősökben fontos szerepet tölt be a lymphoid sejtek irányított migrációjában (Nagasawa, 2014; Mcheik et al., 2019; Medeiros et al., 2021). A stromalis sejtek által szekretált CXCL12 kemokin az emlősök számos szervében és szövettípusában, mint például a thymusban, szívben, tüdőben, májban, csontvelőben, nyirokcsomóban kimutatható (Zou et al., 1998; Ratajczak et al., 2003). Receptora, a CXCR4 (LESTR, Fusin, CD184) egy G-protein kapcsolt 7 transzmembrán régiós receptor (6. ábra), melynek expresszióját először perifériás vér leukocytáin írták le (Loetscher et al., 1994) majd funkcionálisan, mint a HIV (human immundeficiency virus) koreceptoraként kapott nagy figyelmet (Feng et al., 1996). A CXCR4/CXCL12 jelátvitel sejtmigrációban betöltött szerepét először zebrahal primordiális őssejtjein sikerült igazolni (Knaut et al., 2003). Viszont a CXCL12 erős kemoattraktáns hatását már korábban, *in vitro* módon CD34+ hematopoietikus őssejtek, lymphocyta és monocyta sejtek esetén is leírták (Bleul et al., 1996; Aiuti et al., 1997; Ma Q et al., 1998).

A CXCR4/CXCL12 jelátvitel madarak vérképzésben betöltött szerepéről kevés információ áll rendelkezésünkre. Legtöbb kutatási eredmény az emlősök – bursa equivalens – csontvelői hematopoiezise kapcsán került publikálásra. Egér modellen igazolták, hogy az embriogenezis során a CXCL12 direkt módon befolyásolja a CD34+ hematopoietikus sejtek májból csontvelőbe történő migrációját és megtelepedését (Karpova et al., 2015). Felnőtt egerek esetében viszont a hematopoietikus progenitorok csontvelőn belüli megtartásában, perifériára kerülésük megakadályozásában vesz részt

(Lapidot & Kollet, 2002). Ezt alátámasztja a CXCR4 receptor antagonistájával, az AMD3100-al történő kezelés hatása, amely a felnőtt egerek csontvelői hematopoietikus progenitorainak gyors deplécióját idézi elő (Dar et al., 2011). Fontos megemlíteni, hogy az AMD3100 (plerixafor) egy nem-peptid (szimmetrikus biciklám) típusú antagonistája a CXCR4-nek, amely kifejezetten a receptor fő ligandkötő zsebét alkotó aminosavakhoz kapcsolódva gátolja az intercelluláris szignáltranszdukciót (Rosenkilde et al., 2004).



6. ábra: *CXCR4/CXCL12 komplex jelátviteli folyamata.* A CXCL12 kemokin ligand bekötődése a CXCR4 receptorhoz egy kiterjedt intracelluláris jelátviteli hálózatot indít el, a hozzá kapcsolódó heterotrimer G-fehérje Gα alegységének aktiválásával. Az aktivizált Gα alegység disszociál a trimer szerkezetről és a visszamaradt Gβ/Gγ dimerhez hasonlóan kölcsönhatásba lép különböző effektor fehérjékkel. Az aktivált Gα a foszfolipáz C-n (PLC) keresztül hidrolizálja a foszfatidilinozitol-bifoszfátot (PIP2), amely során két másodlagos hírvivő molekát: inozitol-1,4,5-trifoszfátot (IP3) és diacilglicerolt (DAG) generál. Az IP3 útvonalon mobilizálja a kálciumot az endoplazmás reticulumból (ER), míg a DAG közvetítésével számos protein kinázt aktiválva, ideértve a protein kináz C-t (PKC) szabályozza a migrációt és a sejtproliferációt. További receptor stimuláció a mitogén által aktivált protein kináz (MAPK) aktiválásához vezet, amelyet eredetileg extracelluláris szignál szabályozott kináznak (ERK) is neveztek. Ezek a kinázok a kis GTPázok, mint a Ras és Rho fehérjék, aktiválásán keresztül a kemotaxis és sejtciklus szabályozásában vesznek részt. A CXCL12/CXCR4 jelátvitel fő tengelye a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K), majd protein kináz B (AKT) aktivizálódása. A PI3K-AKT-on

keresztüli aktivált B sejt κ könnyűlánc nukleáris faktor enchancer (Nfκb) aktiváció útján befolyásolja a lymphocyta migrációt és kemotaxist. Forkhead boksz O (FOXO) proteinen keresztül a sejt túlélését szabályozza. A CXCR4/CXCL12 kapcsolat számos adhézióban fontos szerepet játszó regulátor molekula foszforilációját is eredményezheti: mint a prolinban gazdag kináz 2 (Pyk-2), Crk-asszociált szubsztrát (CRK), fokális adhéziós kináz (FAK) és a paxilin, amely útvonal szintén hozzájárul a sejtmigráció és sejtciklus befolyásolásához. A PI3K-AKT-NFκb tengely, valamint MEK ½ és ERK útvonal részt vesznek azon transzkripciós faktorok és intracelluláris proteinek aktiválásában, amelyek kifejezetten az őssejt állapot fenntartását eredményezik. *Ábra forrása: Kaiser és munkatársai ábrája alapján rajzolva (Kaiser et al., 2020, Fig. 1).*

A B lymphopoiesis kifejezett zavart szenved CXCR4 vagy CXCL12 homozigóta nullmutáns egerekben (Nagasawa et al., 1996; Ma Q et al., 1998). A CXCR4-/- donorból származó embrionális B lymphocyta progenitorok nem képesek kolonizálni a besugárzással kezelt recipiens állatok csontvelőjét. Később a csontvelői plazma sejtek száma is nagyon alacsony szinten marad (Nagasawa et al., 1996; Ma Q et al., 1998). Felnőtt egerek kondicionált CXCR4 nullmutáns B lymphoid progenitor sejtjei idő előtt lépnek ki a csontvelőből a perifériára és telepednek meg szekunder nyirokszervekben (Nie et al., 2004). Ez is alátámasztja Beck és munkatársainak eredményeit, miszerint a CXCR4 szignalizáció kontrollálja a B lymphocyták csontvelőből perifériára történő emigrációját, valamint a csontvelőn belüli motilitását (Beck et al., 2014).

A 2000-es évek elején csirkében is azonosították a CXCR4 receptor madár homológját (Liang et al., 2001) és a CXCL12 ligandjának mRNS-ét (Read et al., 2005). Embrionális bursa Fabriciin végzett PCR alapú RNS szekvencia vizsgálatok kimutatták, hogy a CXCL12 és CXCR4 egyszerre expresszálódnak a bursa fejlődése során, viszont a bursalis B lymphocyták CXCR4 mRNS-nek expressziós mértéke jelentős mértékben változik az embrionális fejlődés során (Ko et al., 2018).

A CXCR4 mediált szignalizáció és a sejtfelszíni B sejt receptorból (BCR) kiinduló szignáltranszdukció egymással szoros, oda-vissza ható kapcsolatot mutat. Csirke DT40 sejtvonalon (avian leukosis vírus indukálta bursalis lymphoma sejtek) igazolták, hogy a B sejt receptorból kiinduló szignalizáció hatására csökken a sejtfelszíni CXCR4 expressziója, amelynek következménye a sejtek CXCL12 irányú migrációjának hanyatlása lesz (Guinamard et al., 1999). Egér csontvelői B lymphocyta progenitorok esetében a CXCR4/CXCL12 mediált jelátvitel elengedhetetlen a pre-B lymphocyták éretlen B lymphocyta irányba történő differenciációjában, mivel indukálja az

immunglobulin molekula könnyű láncának sikeres rekombinációs folyamatát (Mandal et al., 2019). A CXCR4 receptorból kiinduló szignalizáció immunglobulin gének átrendeződésre kifejtett hatását csirkében is igazolták, miszerint a Rag1/Rag2 enzim indukciós hatását segíti elő (Lee et al., 2022).

Mivel az emlősök csontvelői sejtjeihez képest a bursa Fabricii B lymphocytáinak differenciálódása a többi lympho-myeloid sejtvonaltól elkülönítetten történik, ezért ennek a szervnek a tanulmányozása a B lymphocyta prekurzorok és follikulusok stromális sejtjei által alkotott molekuláris mikrokörnyezet kapcsolatának részletesebb megismerését teszi lehetővé. Továbbá a CXCR4/CXCL12 jelátvitel által befolyásolt bursa specifikus faktorok jellemzése, pontos szabályozási feltárása jelentősen elősegítené a B lymphocyták fejlődését és migrációját irányító folyamatok mélyebb megismerését.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A háziasított madarak az immunológiai és fejlődésbiológiai kutatások gyakran használt kísérletes modell szervezetei. Az emlősökkel szemben a madarak B lymphocytáinak fejlődése és differenciációja nem a csontvelőben, hanem egy bélhez asszociált primer nyirokszervben, a bursa Fabriciiben zajlik. A lymphocyták fejlődését irányító mikrokörnyezet karakterizálását és a lymphoid sejtek ontogenezisének követését laboratóriumunkban hybridoma technikával készült, nagyszámú csirke és gyöngytyúk specifikus monoklonális ellenanyag alkalmazásával közelítettük meg. Kísérletes munkám első felében a 7H3 elnevezésű egér monoklonális ellenanyag immunhisztokémiai és biokémiai karakterizálását végeztem, amely előzetes vizsgálataink alapján a felnőtt gyöngytyúk bursa Fabricii-ben az eddig ismert B lymphocyta markerektől eltérően, csak a corticalis B lymphocyták egy csoportját jelölte. Kísérletes munkám második felében, együttműködésben a müncheni Ludwig-Maximilians Universität Állatorvosi Karának, Komparatív Immunológiai kutatócsoportjával a lymphoid sejtek migrációjában szerepet játszó CXCR4 receptor és kemokin ligandja, a CXCL12 expressziós mintázatának változását követtem a madarak B lymphocytáinak fejlődése során.

Kutatásom céljai a következőek voltak:

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

4. MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti állatok

A vizsgálatokhoz különböző korú gyöngytyúk (*Numida meleagris*) és csirke (*Gallus gallus domesticus*) embriók, illetve kikelt állatok szerveit használtuk fel. A gyöngytyúk tenyész tojásokat a gödöllői Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ, Haszonállat-Génmegőrzési Intézetének Génmegőrzéstudományi - és Kisállattenyésztési Osztálya biztosította számunkra, a kikelt állatokat kistermelőtől (Katona Lajos, K+K farm Kft.) vásároltuk. A White Leghorn fajtájú, SPF (Specific-pathogen-free) csirke tojásokat kereskedelmi tenyésztőktől (Prophyl Kft.) szereztük be. A tojásokat laboratóriumunk saját keltetőgépében (Heka-Brutgerate, TS-7000C) forgatórácson inkubáltuk 37ºC-on, 60%-os páratartalom mellett. Az embriók korának meghatározásához a Hamburger és Hamilton (HH) által leírt stádium beosztást használtuk (Hamburger & Hamilton, 1992). A stádium meghatározása különös jelentőséggel bírt a két faj fejlődésének összehasonlítása során, mivel a gyöngytyúkra hosszabb kelési idő jellemző. A csirke kikelése a megtermékenyítéstől számított 21. napon, míg a gyöngytyúkok esetében a 26-27. napon történik. Az idősebb stádiumú embriók korát az inkubációs napok (E) száma alapján határoztuk meg. A kikelt állatokat néhány napig inkubátorban (37ºC-on) tartottuk, majd a Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetének állatházába kerültek. Kísérleteink végrehajtása során betartottuk a Magyarországon hatályos, a 40/2013 (II.14.) számú Korm. rendelet állatkísérletekről szóló rendelkezéseit. A Pest Megyei Kormányhivatal PEI/001/1775-2/2015 ügyiratszám alatti határozata alapján a Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézete, mint állatkísérleti felhasználó és tenyésztő létesítmény engedély száma: 20/2015. A Semmelweis Egyetem, Munkahelyi Állatjóléti Bizottság által kiállított saját állatkísérleti engedély számom: SEMÁB-B/036/2022.

4.2. Minták szövettani feldolgozása

Kísérleteink során embrionális és felnőtt állatok nyirokszerveit (thymus, bursa Fabricii, lép, coecalis tonsilla) használtuk fel, kontroll vizsgálatainkhoz további szövetmintákat (máj, tüdő, vese, agy) is feldolgoztunk. Az embrionális szervek kivételét és az utópreparációs munkálatokat sztereomikroszkóp alatt, mikropreparációra alkalmas

eszközökkel (mikroolló, csipesz, rovartűk, embrióspatula) végeztük. A kivett szervekből immuncitokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokra zselatinos fagyasztott blokkokat készítettünk. A félvékony metszetek műgyantába ágyazott mintákból készültek.

4.3. Zselatin-szacharózos fagyasztott blokk készítése

Az izolált szerveket 1 órán keresztül fixáltuk pufferelt 4%-os paraformaldehidben (PFA), majd foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS; pH 7,2) háromszor 5 percig mostuk. A szerveket a fixálást követően, egy éjszakán át PBS alapú, 15%-os szacharóz oldatban 4°C-on tartottuk. A beágyazást megelőzően az explantátumot 37°C-on, 1 órán keresztül 15% szacharózt (Reanal puris, M:342,30) és 7,5% zselatint (Fluka, 04055) tartalmazó PBS-ben inkubáltuk. Az így impregnált szerveket előre, a beágyazó műanyag formákba kiöntött zselatinágyra helyeztük, majd néhány percig vártunk, hogy a szervek a zselatin ágyhoz tapadjanak. Ezután meleg zselatinnal teljesen befedtük ezeket és 4°C-on, 3 percig szilárdulni hagytuk. A kívánt méretű zselatinos blokkokat körbevágással alakítottuk ki és Shandon Cryomatrix-szal (Anatomical Pathology Ind., 67690006) feliratozott kartonpapírra rögzítettük. Végül folyékony nitrogénnel -60°C-ra lehűtött izopentánban (2-metilbután; Sigma-Aldrich, M32631) lefagyasztottuk, felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.4. Műgyantás blokk készítése

A félvékony metszetek készítéséhez felhasznált szövetmintákat 4%-os pufferolt glutáraldehidos oldatban fixáltuk 24 órán keresztül 4°C-on. A további lépéseket elszívó fülke alatt végeztük. A fixált szerveket 3x5 percig mostuk Milloning pufferrel szobahőmérsékleten, majd a mintákat 2 órán keresztül utófixáltuk 1%-os ozmium tetroxiddal (OsO_4). A beágyázás megkezdése előtt felszálló alkoholsorral (50%, 70%, 80%, 90%, 96%-os etanol 10-10 percig, végül 99,8%-os etanollal 3x20 percig) dehidráltuk a szövettani mintákat. A víztelenítés utolsó lépéseként propilén-oxidba (Merck, 12492) helyeztük a mintákat 2x5 percig. Mivel a propilén-oxid oldja a műanyagot, így ezt a lépést üveg eszközökkel végeztük. A következő lépésben a szerveket propilén-oxid és EPON gyanta 1:1 arányú keverékében, 45 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk, és végül 45 percig tiszta EPON gyantában impregnáltuk. Az inkubációs idő elteltével a mintákat EPON gyantával feltöltött gumicsónakokba (SPI,

2442) helyeztük, minél közelebb helyezve azokat a leendő metszési felszínhez, majd a kiöntött blokkokat 56°C-os termosztátban, 1 napon át polimerizáltattuk. Metszés során 1 µm vastag szövettani félvékony metszeteket készítettünk, amelyeket 1%-os toluidinkék (Merck, 115930) oldattal festettünk meg.

4.5. Beágyazáshoz használt oldatok

Koncentrált (10x) PBS puffer: 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,2 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$; 2 g KH_2PO_4; 1000ml desztillált víz. A további pufferek elkészítéséhez a koncentrált (10x) PBS oldatot 10-szeres hígításban alkalmaztuk (1xPBS).

A szacharóz tartalmú PBS puffer: 15 g D-szacharózt oldottunk fel 100 ml 1xPBS-ben, majd az oldatot 4ºC-on, hűtőben tároltuk.

A szacharóz és zselatin tartalmú 1x PBS puffer: D-szacharózt (15 m/V%) és zselatint (7,5 m/V%) tartalmazó 1xPBS puffer, amelyet felhasználásig -20ºC-on fagyasztva tároltuk.

Pufferelt 4%-os paraformaldehid (pH=7,4): 60ºC-os, 700 ml desztillált vízhez 40 g paraformaldehidet adtunk, és mágneses keverőre helyeztük. A keletkezett csapadékot cseppenként hozzáadott, 20%-os (0,5 M) NaOH-dal oldottuk fel. Az oldatot megszűrtük, majd 250 ml 1xPBS-t adtunk hozzá. Még mindig mágneses keverőn beállítottuk a pH-t, majd az oldatot átöntve 1000 ml-es mérőhengerbe, a térfogatát desztillált vízzel egészítettük ki 1000 ml-re. Végül 15 ml-es csövekbe kiöntve -20ºC-on tároltuk.

Milloning puffer: 830 ml 2,26% Na_2HPO4 $2H_2O$ (Merck, 106462) és 170 ml 2,52% NaOH (Merck, 1.06346.1000) keveréke.

4%-os glutáraldehid: 52,5 ml Milloning puffer és 10 ml 25% glutáraldehid (SPI-Chem, 02607-BA)

1%-os ozmium tetroxid: 1g OsO_4-ot (Merck, B000970) 50 ml desztillált vízben feloldva 2%-os oldatot készítettünk, amelyet kiporciózva -20ºC-on tárolunk. Közvetlen felhasználása előtt Milloning pufferrel kétszeresére hígítottuk.

EPON gyanta keverék: 30 ml Araldite Resin Grade 6005 (EMS, 10920), 30 ml Poly-bed 812 (EMS, 14900), 30 ml DDSA (Dodenyl Succinic Anhydride) (EMS, 13710), 20 ml NMA (Nadic methyl Anhydride) (EMS, 19000) összemérése és üvegbottal való

összekeverése után 2,2 ml DMP 30 (2,4,6-Tris Dimethyl aminomethylphenol) (EMS, 13600) térhálósítót adtunk hozzá.

4.6. Metszet készítése

A zselatinos blokkok metszésére Shandon gyártmányú kriotómot használtunk, a metszést -28ºC-os munkahőmérsékleten végeztük. A metszés előtt a blokkokat a kriosztátba helyeztük, hogy felvegyék annak hőmérsékletét. A mintákból 8-12 µm vastag metszeteket készítettünk, amelyeket poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezre vettünk fel. Felhasználásukig -20ºC-on, tékába rendezve tároltuk.

A műgyantás metszetek készítése Reichert Ultracut ultramikrotóm használatával történt. Az 1 µm vastag metszeteket tárgylemezekre kicseppentett desztillált vízre helyeztük, majd a teljes száradás után, 63-67ºC-on, 1 percig még állni hagytuk. Felhasználásukig tékába rendezve tároltuk.

4.7. Vérkenet készítése

A perifériás keringésben jelen lévő 7H3 pozitivitást mutató sejtek vizsgálatához vérkenetet készítettünk. A minta 6 hetes gyöngytyúkból származott, közvetlenül dekapitációt követően. A szárny vénából inzulinos fecskendő segítségével vettünk vért, amelybe előzetesen heparint szívtunk fel (1ml vérhez 0,1 ml heparin). A levett vérből 1 cseppet helyeztünk a tárgylemezre, majd egy másik tárgylemez segítségével vérkenetet készítettünk. Ezt követően szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd száradás után 10 percig metanolban (Sigma-Aldrich, 32213) fixáltuk. Felhasználásig -20ºC-on tároltuk.

4.8. 7H3 monoklonális ellenanyag készítése

A 7H3 elnevezésű monoklonális ellenanyag a 2000-es években, hybridoma technikával készült, amely során 8 hetes gyöngytyúk bursa Fabricii sejtszuszpenziójával immunizáltak Balb/c egereket (Nagy et al., 2001). Kísérletes munkám során immunhisztokémiai, immunfluoreszcens, valamint *in vitro és in vivo* vizsgálatainkhoz a 7H3-as hybridoma sejttenyészet felülúszóját használtam, mint 7H3 monoklonális ellenanyagot. Az ellenanyag izotipizálásának meghatározását ELISA kit alkalmazásával végeztük, mely alapján a 7H3 monoklonális ellenanyag izotípusa: IgG_{2b}.

A hybridoma sejtklónok tenyésztését, fenntartását steril körülmények között; lamináris fülke alatt (Napco NapFlow 1200 Class II A/B3 Biosafety Cabinet), steril, egyszer használatos eszközök felhasználásával (sejttenyésztő flaskák, centrifuga csövek, szerológiai pipetta hegyek) végeztem.

4.8.1. 7H3-as hybridoma sejttenyésztése és felülúszójának gyűjtése

A 7H3-as hybridoma klónt tartalmazó csövet folyékony nitrogénből (-196°C) kiemelve azonnal 37°C -os vízfürdőbe helyeztük, 5-10 percre, míg teljesen ki nem olvadt a benne lévő sejtszuszpenzió. A csöveket steril fülke alá helyeztük, kívülről 70%-os alkohollal lemostuk, majd tartalmukat steril 15 ml-es centrifuga csövekbe mértük át. A sejtekhez fokozatosan (2-3 perc alatt) előmelegített (37°C -os) komplett hybridoma médiumot (kb 10 ml) pipettáztunk, miközben enyhén meg-megráztuk a centrifugacsöveket. Annak érdekében, hogy a fagyasztó médiumot (10%-os dimetil szulfoxid tartalmú krioprotektív oldat, DMSO) eltávolítsuk, centrifugálást (10 perc, 500 g) végeztünk, majd a felülúszót leöntöttük. A centrifugacső aljában összegyűlt sejteket 37°C -os komplett hybridoma médiummal felszuszpendáltuk (10 ml), majd tenyésztő flaskába porcióztuk (10 ml sejtszuszpenzió/tenyésztő flaska). A sejttenyésztést széndioxid termosztátban (5% CO_2, 37°C és közel 100%-os páratartalom) végeztük.

A nagyobb mennyiségű felülúszó kinyerése érdekében, a 7H3-as hybridoma sejttenyésztése 10 napig zajlott, amely során kezdetben naponta, majd 2-3 naponta passzáltuk a sejteket. Az első passzálás 24 óra inkubációt követően történt. Lamináris fülke alatt a tenyésztő flaska teljes tartalmát három felé osztottuk; 3-3 ml hybridoma sejtszuszpenziót mértünk át új tenyésztő flaskákba, majd a folyadékszintet komplett hybridoma médium hozzáadásával 10 ml-re egészítettük ki. A szétosztott sejteket termosztátban további két napig inkubáltuk. A passzálások között a sejtek állapotát minden nap inverz mikroszkóp (Zeiss Axiovert 135 inverted Phasecontrast Microscope) alatt ellenőriztük.

A 7H3-as hybridoma sejttenyészet felülúszójának első begyűjtése a második passzálást követően (a sejttenyésztés 6. napján) történt. Valamennyi flaska tartalmát steril 50 ml-es centrifuga csövekbe gyűjtöttük, majd 7 percig, 500 g-n, 21°C -on centrifugáltuk. A centrifugálást követően az ellenanyagot tartalmazó felülúszót 50 ml-es csövekbe öntöttük. Az immunfestésekhez szánt felülúszóhoz a hosszabb eltarthatóság érdekében,

10%-os nátrium-azidot (1:100 arányban) adtunk és 4ºC -on tároltuk. Funkció blokkoló kísérletekhez a nátrium-azid mentes felülúszókat felhasználásig -20ºC-on fagyasztva tároltuk. A sejttenyészet további két passzáláson esett át, miközben a felülúszót ismételten begyűjtöttük.

4.8.2. 7H3 ellenanyagot tartalmazó felülúszó tisztítása

A 7H3 ellenanyag tisztítása frissen felvett 7H3 hybridoma sejtkultúra felülúszójából történt affinitáskromatográfia elvén működő, izotípus specifikus Protein G Agarose oszlop (Nab™ Protein G Spin Columns, Thermo Scientific, 89953) felhasználásával, a gyártó által ajánlott protokoll szerint. A megtisztított 7H3 monoklonális ellenanyag koncentrációját spektrofotometriás méréssel (Hitachi-2001, sorozatszám:9826-010, Tokyo, Japan) 280 nm hullámhosszon mértük meg. A standard sor beméréséhez 20, 40, 80, 100 µg/ml borjúsavó oldatot (Bovine Serum Albumin; BSA Sigma, A9647) használtunk. A megtisztított, ismert koncentrációjú 7H3 monoklonális ellenanyagot kifejezetten funkció blokkoló vizsgálataink (*in vitro* migrációs teszt és *in vivo* chorioallantois membrán kísérlet) esetében alkalmaztuk.

4.8.3. 7H3 monoklonális ellenanyag gyűjtéséhez használt oldatok

Komplett hybridoma médium: Elkészítése során az egyes komponenseket steril fülke alatt mértük össze; 500 ml végtérfogatot létrehozva. Az elkészült oldatot 4ºC -on tároltuk. Összetétele: 430 ml RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement (TermoFischer, 61870036), 50 ml foetalis borjúsavó (Fetal Calf Serum, FCS; Sigma, F9665), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Sigma, P0781), 5 ml MEM Non Essential Amino Acid Solution (Sigma, M7145), 5 ml MEM Vitamin Solution (Sigma, M6895), 5 ml Hepes Solution (Sigma, H0887), 500 µl 2-Mercaptoethanol (Sigma, M6250).

Fagyasztó médium: DMSO (Sigma, D2650) és 10%-os foetalis borjúsavó (Fetal Calf Serum, FCS; Sigma, F9665) 1:9 arányú oldata.

10%-os nátrium-azid: 10 µl nátrium-azid (Sigma 08591) 1 ml desztillált vízben hígítva.

4.9. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia

Az immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokat fagyasztott metszeteken végeztük.

4.9.1. Immunhisztokémia

A metszeteket 1xPBS-ben, 10 percig, szobahőmérsékleten rehidratáltuk (a zselatinos metszeteket először a zselatin kioldása érdekében, néhány percre előre felmelegített 1xPBS-be helyeztük, majd szobahőmérsékletű 1xPBS-be raktuk). Ezt követően rámértük a metszetekre a primer ellenanyagot (2. táblázat) (50-80 µl/metszet), amely vagy egy monoklonális ellenanyagot tartalmazó, hígítatlan sejttenyészet felülúszója vagy előzetesen betitrált hígítású ellenanyagoldat volt. A szükséges hígításokat 1%-os BSA-t tartalmazó, 1xPBS oldatban (PBS-BSA) végeztük. A primer ellenanyaggal lefedett metszeteket 45 percig, szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltuk, amelyet mosás követett 1xPBS-ben (3x5 perc). Következő lépésként PBS-BSA-ban hígított, biotinilált szekunder ellenanyagot (3. táblázat) vittünk fel a metszetekre, amellyel további 45 percig inkubáltunk (szobahőmérsékleten és nedves kamrában). Ezután újabb mosás történt 1xPBS-ben (3x5 perc). A szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolása érdekében a metszeteket 1xPBS-ben hígított, 3%-os H_2O_2-ba (Sigma-Aldrich, H1009) helyeztük 10 percre. A háromszori 1xPBS mosás után avidin-biotin-peroxidáz komplexet (ABC; Vectaststain Elite ABC-HRP kit; Vector Laboratories, PK-6100) pipettáztunk a metszetekre, és fél órán át inkubáltuk így őket. Az ABC-t a cég által megadott arányban 1xPBS-ben hígítottuk. Először az avidin oldatot mértük bele a PBS-be, majd ehhez megfelelő mennyiségben adtunk a biotinilált peroxidázt tartalamzó oldatból, alaposan felkevertük, és fél óra állás után használtuk fel. Mosás (1xPBS, 3x5 perc) után a kötődött peroxidáz enzim aktivitását kloronaftollal detektáltuk (Sigma, C8890). Előzetesen a kloronaftolt előre elkészített törzsoldatából hígítottuk ki PBS-ben (100 µl kloronaftol törzsoldat 100 ml 1xPBS-ben oldva), amelyet sötétben mágneses keverőn legalább fél órát kevertettünk. Felhasználás előtt szűrőpapíron átszűrtük, és 3%-os H_2O_2-ot (500 µl) adtunk hozzá. A metszeteket ebben az oldatban 30 percig sötétben inkubáltuk. Az utolsó mosást (1xPBS, 3x5 perc) követően a metszeteket vízoldékony fedőanyaggal (Poly-Aqua Polyscience Inc., Warrington PA, USA; 18606) fedtük le és 4°C-on hűtőben tároltuk.

4.9.2. Immunfluoreszcencia

Egyszeres immunfluoreszcencia

A metszetek előkészítését, primer ellenanyaggal való inkubálását az immunhisztokémiai fejezetben leírtakkal azonos módon végeztük. Ezután kihígított szekunder ellenanyagot (50-80 µl/metszet) mértünk a metszetekre. Ez lehetett közvetlenül fluorokrómmal konjugált (4. táblázat) vagy csak biotinilált ellenanyag. Az inkubálást 45 percig, szobahőmérsékleten, fénytől védetten, nedves kamrában végeztük. A biotinilált szekunder ellenanyagok bekötődésének detektálására streptavidinnel kapcsolt fluorokrómot (Invotrogen; Streptavidin, Alexa-Fluor 594, S32356 és Streptavidin, Alexa-Fluor 488, S32354) alkalmaztunk, amely ismételt 45 perces, fénytől védett inkubálást igényelt. Az inkubálások között és után 1xPBS-sel mostuk a metszeteket 3x5 percig. A sejtmagok kimutatására DAPI-t (4,6 diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride; Invitrogen, D1306) használtunk, 1xPBS-ben hígítva 1µg/ml arányban, 15 perces inkubálási idővel. Az utolsó mosást követően a metszeteket lefedtük és sötétben, 4ºC-on tároltuk.

Kettős immunfluoreszcens festés

Annak érdekében, hogy a 7H3 ellenanyag által jelölt molekula expresszióját egyéb antigénekkel is összehasonlítsuk, kettős immunfluoreszcens festéseket végeztünk.

A kettős festés során első lépésben a metszetekre rámértük az első primer ellenanyagot, amelyet a fentiekben említett körülményekkel azonos módon 45 percig inkubáltunk. A mosást követően (1xPBS, 3x5 perc) közvetlenül fluorokrómmal kapcsolt szekunder ellenanyagot vittünk fel a metszetre (4. táblázat), amely a primer ellenanyagnak megfelelő faj és/vagy izotípus specifikus volt. A munkafolyamat további lépéseit fénytől védetten végeztük. 45 perces, nedves kamrában történő inkubálás után 1xPBS-ben mostuk a metszeteket (3x5 perc). Ezután vittük fel a második primer ellenanyagot, amellyel újból 45 percig inkubáltunk, és a végén 1xPBS-ben (3x5 perc) mostuk. A második szekunder ellenanyagot úgy választottuk meg, hogy annak gerjesztési hullámhossza eltérjen az előzőleg használt szekunder ellenanyagétól. A szekunder ellenanyag metszetekre való pipettázását 45 perces inkubáció követte. A sejtmagok kimutatására DAPI-t használtunk, amelyet 15 percig hagytunk a lemezeken. A mosás

után (1xPBS) a metszeteket vízoldékony anyaggal fedtük le, majd hűtőben, 4ºC-on tároltuk.

4.9.3. Az immunfestés során alkalmazott primer és szekunder ellenanyagok, előhívószerek, oldatok

Primer ellenanyagok

2. táblázat: Primer ellenanyagok
A 2. táblázat tartalmazza a klón nevét, az ellenanyag izotípusát, a felismert molekulát, milyen sejtek detektálását teszi lehetővé és a beszerzés forrását.

Primer ellen-anyag	**Klón**	**Izo-típus**	**Antigén specificitás**	**Felismert sejttípusok**	**Beszerzés forrása/ Forgalmazó**
chB6	BoA1	IgG1	Bu-1a + Bu-1b	B sejtek (kivétel a plazma sejtek) és a makrofágok egy alcsoportja	saját laboratóriumunkban kifejlesztve (Igyártó et al., 2008)
chB6	AV20	IgG1	Bu-1a + Bu-1b	B sejtek	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA
7H3	7H3	IgG_{2b}	80 kDa-os sejtfelszíni molekula	bursalis B sejtek egy alpopulációja és T sejtek	saját laboratóriumunkban kifejlesztve (Fejszák et al., 2022)
QH1		IgG1	α- makro-globulin	minden hematopoietikus és endothel sejt, kivéve erythrocyták (fürj és gyöngytyúk)	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-caspase	5A1	Poli-klonális nyúl	17 kDa-os aktivált caspase-3	apoptotikus marker	Cell Signaling
EIV-E12		IgG1	205 kDa-os sejtfelszíni molekula	minden B sejt, plazma sejt, és a BSDC prekurzorok	Todd Pharr (USA) szívességből
LT2		IgG1	ismeretlen	bursai follikulusok corticalis B sejtjeinek egy része, és a perifériás B-sejtek 60%-a	Michael J.H.Ratcliffe (Canada) szívességből
Laminin	3H11	IgG1	laminin	basalis membrán	Developmental Studies Hybridoma Bank

Primer ellen-anyag	**Klón**	**Izo-típus**	**Antigén specificitás**	**Felismert sejttípusok**	**Beszerzés forrása/ Forgalmazó**
GTr1		IgG1	ismeretlen	thrombocyta	saját laboratóriumunkban kifejlesztve (Bódi et al., 2009)
N1C2		IgG1	30 kDa protein	madár dendritikus sejtek	saját laboratóriumunkban kifejlesztve (Nagy et al., 2001)
Polyclonal rabbit anti-CD3		Poli-klonális nyúl	humán-CD3	humán T sejt, keresztreagál csirkével és gyöngytyúkkal	Dako
CD45	HISC7	IgG2a	egér-CD45	közös leukocyta marker	Prionics/Thermo Fisher Scientific
CD45	UM16-6	IgG2a	csirke-CD45	csirke leukocytái és hematopoietikus sejtek	Viertlboeck and Gobel, 2007
Foszfo-hiszton-H3	Ser10	Poli-klonális nyúl	Phospho-Histon H3	G2 fázisban lévő sejtek	Cell Signaling
CXCR4	9D9	IgG2a	CXCR4 receptor	különböző leukocyta szubpopulációk	Dr. Sonja Härtle, München szívességből
BID3		IgG1	220 és 320 kDa protein izoformái	makrofág	saját laboratóriumunk-ban kifejlesztve (Gumati et al., 2003)
Anti-cyto-keratin	Lu-5	IgG1	cytokeratin	hámsejtek	Millipore
N-cadherin	6B3	IgG1	sejt adhéziós molekula	idegszövet	Developmental Studies Hybridoma Bank

Szekunder ellenanyagok

3. táblázat: Szekunder ellenanyagok
A 3. táblázat tartalmazza a biotinilált és peroxidáz kapcsolt szekunder ellenanyagok nevét, forrását és katalógus számát. A szekunder ellenanyagokat PBS-BSA-val 1:200 arányban hígítottuk.

Megnevezés	Forrás	Katalógus szám
lóban készült biotinilált anti-egér IgG (H+L)	Vector Laboratories	BA-2000
kecskében készült biotinilált anti-nyúl IgG (H+L)	Vector Laboratories	BA-1000
kecskében készült peroxidáz kapcsolt anti-egér IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2005

4. táblázat: Fluorokrómmal kapcsolt szekunder ellenanyagok
A 4. táblázatban szereplő fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyagokat az Invitrogen-től (Life Technologies) rendeltük. Az ellenanyagok kecskében készültek. A cellák tartalmazzák a faj és izotípus specifitást, a fluoreszcencia csúcsintenzitást és a katalógus számot. A szekunder ellenanyagokat 1xPBS-ben, 1:100 arányban hígítottuk.

szekunder ellenanyag	fluorokrómok excitációs hullámhossza	
	488	594
anti-egér IgG (H+L)	A-11001	A-11005
anti-egér IgG1 (γ1)	A-21121	A-21125
anti-egér IgG2b (γ2b)	A-21141	A-21145
anti-egér IgG2a (γ2a)	A-21131	A-21135
anti-nyúl IgG (H+L)	A-11008	A-11012

4.9.4. Immunhisztokémiához és egyéb szövettani festésekhez felhasznált oldatok

Kloronaftol: 250 mg/ml-es törzsoldat készítéséhez 500 mg 4-chloro-1-naphtolt (Sigma, C8890) oldottunk fel 2 ml abszolút etanolban (Molar Chemicals Kft, 02910-101-340) majd -20ºC-on tároltuk. Előhíváskor a törzsoldatból frissen hígítottunk, mely oldat koncentrációja 0,25 mg/ml volt.

1%-os PBS-BSA oldat: 1 g BSA-t (Sigma, A9647) 100 ml PBS-ben oldottunk fel. Szűrés után 0,1 %-ban NaN_3-ot adtunk hozzá.

1%-os toluidinkék oldat: 5 g toluidinkék ($C_{15}H_{16}ClN_3S$; Merck, 115930), 500 ml 2%-os bórax (di-nátrium-tetraborát-dekahidrát, Merck, 106308) oldatban feloldva. Festés előtt közvetlenül átszűrve.

Hematoxylin-oldat: A és B oldat 1:1 arányú keveréke. (A oldat: 10 g hematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6xH_2O$; Merck, 517-28-2) 100 ml, 96%-os alkoholban feloldva, érlelve (törzsoldat), majd 96%-os alkohollal 10x-esre hígítva. B oldat: 1 ml (40%-os) ferrum-sesquikloratum desztillált vízzel 100ml-re kiegészítve, és hozzáadva 10 csepp cc. sósav).

Eosin-oldat: Eosin ($C_{20}H_8Br_4O_5$ Merck, 15086-94-9) 0,3%-os desztillált vizes oldata.

4.10. Metszetek értékelése és képfeldolgozás

A metszetek vizsgálata fény-, fluoreszcens (Nikon Eclipse E800), konfokális pásztázó (Zeiss LSM 780), valamint STED (Abberior Expert Line- Nikon Ti2) mikroszkópokkal történt. A digitális kamerával készített képek feldolgozását ImageJ, illetve Adobe Photoshop CC 2020 programok segítségével végeztük.

4.11. SDS gélelektroforézis és Western blot

4.11.1. Minta

A 7H3 monoklonális ellenanyag által jelölt antigén (7H3 antigén) molekulatömegét gélelektroforézis és Western blot segítségével határoztuk meg. 6 hetes gyöngytyúk bursa Fabricii és thymus lebenyeiből nyert sejteket lizáló pufferrel kezeltünk, majd az így kapott lizátumot vizsgáltuk SDS-PAGE technikával.

4.11.2. Lizátum készítése

Első lépésben sejtszuszpenziót készítettünk. A kivett, környező szövetektől megtisztított thymus lebenyek és izolált bursa redők tömegét lemértük, majd óraüvegre helyezett, PBS-el átnedvesített kétrétegű Whatman kvalitatív szűrőpapírra (10 µm pórusméret; MilliporeSigma WHA1091150) raktuk, és olló segítségével apró darabokra vágtuk. Ezután a szerv darabokat a szűrőpapírba csomagoltuk, kevés PBS hozzáadása után görbült csipesszel óvatosan nyomkodtuk a papír felszínét (a papír pórus mérete miatt a lymphocytákat átengedi). A kvalitatív szűrőpapíron átszűrődő sejt szuszpenziót 15 ml - es centrifuga csőbe gyűjtöttük, majd 4ºC-on, 520 g-vel, 25 percig centrifugáltuk.

A kiülepedett sejtekhez lízis puffert mértünk (előzetesen lemért 1 g szövethez 1 ml lízis puffert). Jégen, egy órát állni hagytuk, közben néhányszor alaposan felkevertük. A legvégén 10 percig, 4°C-on, 21000 g-vel centrifugáltuk, a keletkezett felülúszót tiszta centrifuga csőbe mértük át, és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

4.11.3. Minta előkészítése

Egy tiszta 1,5 ml-es centrifuga csőbe 1:1 arányban mértük össze a mintát és a Laemmli puffert. Redukált mintáink esetében a Laemmli puffert 10%-os 2-merkaptoethanollal egészítettük ki. Az elegyet 4 percre forrásban lévő vízbe helyeztük, végül a mintákat a gélre rétegeztük.

4.11.4. Gélek összemérése

A gélöntés Bio-Rad gélöntővel történt és a folyamatot vízszintező asztalon végeztük. A két üveglapot (gyárilag távtartóval ellátott) gélkazettába fogtuk be, majd a gélkazettát az alján gumicsíkkal ellátott gélöntő állványra helyeztük. Ezután kezdtük meg az alsó gél összemérését.

Alsó gél vagy szeparáló gél

Az alsó gél komponenseit (5. táblázat) folyamatos, enyhe keverés mellett összemértük, ügyelve a buborék képződésére. Az ammónium perszulfátot (APS) és a tetrametil-etilén-diamint (TEMED; Bio-Rad, 161-0801) ebben a sorrendben, a legvégén adtuk az elegyhez. Ezt követően a gélt (kb 4 ml) pipettával a két üveglap közé folyattuk, majd a gél tetejére vizes amilalkoholt (kb 0,5-1 ml) rétegeztünk a felület kiegyenlítésének céljából. 45 perc polimerizációs idő után az amilalkoholt leöntöttük, és a gél tetejét háromszor átmostuk ultratiszta vízzel (UTV).

5. táblázat: Alsó gél összetétele. A végtérfogata 12 ml.

ALSÓ GÉL	12 %
ultratiszta víz (UTV)	5,22 ml
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	3 ml
10% (w/v) SDS-oldat	120 µl
40% Akrilamid/Bis oldat	3,6 ml
10% ammónium-perszulfát (APS)	60 µl
tetrametil-etilén-diamin (TEMED)	6 µl

Felső gél vagy koncentráló gél

A felső gél összetevőit (6. táblázat) ugyanúgy mértük össze, mint az előző esetben. A gél öntése előtt a fésűt ferdén behelyeztük a két üveglap közé, majd az összemért gélből körülbelül 1 ml-t lassan rápipettáztunk a polimerizálódott alsó gél tetejére. Végül a fésűt a helyére állítottuk ügyelve arra, hogy a fogai alatt ne maradjon buborék. A gélt szobahőmérsékleten 45 percig hagytuk polimerizálódni.

6. táblázat: Felső gél összetétele. A végtérfogata 10ml.

FELSŐ GÉL	40 %
ultratiszta víz (UTV)	6,425 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
10% (W/V) SDS-oldat	100 µl
40% Akrilamid/Bis oldat	0,975 ml
10% ammonium perszulfát (APS)	50 µl
tetrametil-etilén-diamin (TEMED)	10 µl

4.11.5. SDS gélelektroforézis futtatás

A polimerizációs idő lejárta után az üveglapokat belepattintottuk az elektród tartóba és ezt a szerkezetet a futtató kádba helyeztük. Futtató pufferrel feltöltöttük a két gél közötti, belső kamrát, a maradékot a kazettákon kívülre öntöttük. Ezután a mintákat (15-20 µl/zseb) a kialakított zsebekbe mértük Hamilton fecskendő segítségével (a molekulasúly standardból 5 µl-t vittünk fel az első zsebbe). Majd a futtatás szobahőmérsékleten, 200 Volt-on, 50 percig tartott.

4.11.6. Blottolás nitrocellulóz membránra

Futtatást követően a gélt tálkába kiöntött blottoló pufferbe helyeztük. A blottoláshoz a következőket raktuk össze megfelelő sorrendben: szűrőszivacs, 2 db szűrőpapír, gél, nitrocellulóz membrán, 2 db szűrőpapír, szűrőszivacs (előzetesen minden elemet blottoló pufferbe áztattuk). Ezeket összezártuk, a blottoló edénybe helyeztük, majd a kádat blottoló pufferrel feltöltöttük. A kádba egy jégakkut és egy keverőbabát is elhelyeztünk, a túlmelegedés ellen és az egyenletes hőmérséklet fenntartása érdekében. 100 Volt-on, 60 percig blottoltunk. PBS-es mosást (2x 10 perc) követően, a membránt 5%-os zsírtalan tejporos oldatban blokkoltuk 1 éjszakán keresztül, 4°C-on, hűtőben.

4.11.7. Immunjelölés

A membránt az 5%-os zsírtalan tejpor oldatból kivéve PBS-Tweenben mostuk (3x5 perc), majd a zsebeknek megfelelően, szikével csíkokra vágtuk. Ezeket parafilmmel kibélelt tálkákba helyeztük, majd rámértük a primer ellenanyagot, majd a 2 órás inkubációs idő elteltével a membránokat 3%-os zsírtalan tejpor tartalmú PBS-Tweenben mostuk (3x5 perc). Szekunder ellenanyagként tormaperoxidázzal kapcsolt ellenanyagokat (anti-egér IgG (H+L)-HRP, 3. táblázat) használtunk, amelyeket előzetesen 3%-os, zsírtalan tejpor tartalmú PBS-Tweenben hígítottunk (1:2500) és 2 óráig szobahőmérsékleten hagytuk a membrán csíkokon. A mosást követően (zsírtalan tejporos PBS-Tweenben 3x5 perc), az immunreakciót kemilumineszcens reagenssel (Luminata Classico Western HRP substrate, Millipore WBLUC0100) röntgenfilmre hívtuk elő a gyártó által megadott protokoll szerint.

4.11.8. Lizátum készítéshez és Western blotthoz használt oldatok és előhívószerek

Lízis puffer: 150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 1% TritonX 100; 0,1% SDS; proteáz inhibítor (Roche Complete Mini, Roche, Sigma-11836153001).

Vizes amilalkohol: 50 ml amilalkohol (Reanal, 01136) 5 ml UTV-ben oldva (szobahőmérsékleten tárolva).

5x futtató puffer: 9 g Tris; 43,2 g glicin (Sigma, G8898); 3 g SDS (Bio-Rad, # 1610302); 600 ml UTV (4°C-on tárolva).

10x blot puffer: 30,3 g Tris (Bio-Rad, 161-0719); 144 g glicin; 800 ml UTV; 200 ml methanol (4°C-on tárolva).

PBS-Tween: 200 ml 10xPBS; 1800 ml UTV; 1 ml Tween 20 (Reanal, 20142) (szobahőmérsékleten tárolva).

Laemmli puffer: 1 ml 0,5 M Tris puffer (pH 6,8); 0,8 ml glicerin; 1,6 ml 10% SDS 0,004%-os brómfenolkék UTV-ben.

Redukáló puffer: 1 ml 0,5 M Tris puffer (pH 6,8); 0,8 ml glicerin; 1,6 ml 10% SDS 0,4 ml merkaptoethanol; 0,004%-os brómfenolkék UTV-ben (-20°C-on tárolva).

10% -os ammónium perszulfát /$(NH_4)_2$ S_2O_8/: 100 mg APS (Bio-Rad, 161-0700) 1 ml UTV-ben oldva.

5%-os zsírtalan tejpor (blokkoló) oldat: 5 g zsírtalan tejpor (Cell Signaling, 9999) 100 ml PBS-Tweenben oldva.

4.12. Szikhólyag *in ovo* tenyésztése

A gyöngytyúk embrió szikhólyag vérszigeteiben kimutatható 7H3+ sejtek extraembrionális megjelenésének detektálására a szikhólyag *in ovo* tenyésztését alkalmaztuk, amely technikát Dr. Dóra Dávid munkatársammal közösen fejlesztettünk ki (Dóra et al., 2017). Ennek során, még a keringés megindulása előtt (mely a HH12-HH13 stádiumban történik) eltávolítottuk a HH10-es stádiumú embriót (a megtermékenyítéstől számolt 36-42 órás inkubálást követően) a tojásból, elválasztva annak extraembrionális részeitől. Első lépésként a légkamra felőli oldalon injekciós fecskendő segítségével 1-2 ml tojásfehérjét szívtunk le, majd a tojásokat a lateralis oldalukon nyitottuk meg (ablakszerűen), a meszes héj, illetve az alatta található héjhártya eltávolításával. Ezzel láthatóvá vált a fejlődő embriópajzs, amely felületére steril, Penicillin/Streptomicin tartalmú PBS oldatot pipettáztunk. Az embriópajzsot fedő felszíni perivitellinaris membrán eltávolítása után, Moria Pascheff-Wolff rugós olló segítségével az embriót körülvágva, teljes ablációt végeztünk. A mikrosebészeti vágás nemcsak az embrió ablációját, hanem az area pellucida vágott széleinek egymással történő illeszkedését is eredményezi, megakadályozva ezáltal, hogy az alatta elhelyezkedő szikanyag kiszivárogjon. Az így létrejött embrió nélküli szikhólyag tenyészeteket további két napig inkubáltuk 37ºC -os keltetőben. Az inkubációs idő eltelte után az épen maradt szikhólyagokat teljesen izoláltuk a tojásokból (n=7), majd 1x1 cm-es darabokra vágva, 4 % PFA-ban, két órán át fixáltuk. Zselatinos beágyazást követően immunhisztokémiára készítettük elő.

4.13. Ellenanyag-antigén kapcsolódásán alapuló funkció blokkoló vizsgálatok.

Az *in vitro* funkcionális vizsgálatok egyik módszere a vizsgált molekulát specifikusan felismerni képes ellenanyag sejttenyészethez adása. Számos alkalommal alátámasztották, hogy a célmolekulához bekötő ellenanyag funkció blokkoló hatást kifejtve akadályozza antigénjének normál működését, a receptorból kiinduló

szignáltranszdukciót, megzavarja a normál receptor ligand kapcsolódást vagy gátolhatja a sejtadhéziót (George-Weinstein et al., 1997; Xiao et al., 2016). Annak érdekében, hogy a 7H3 monoklonális ellenanyag által felismert antigén funkcióját jellemezzük, *in vivo* és *in vitro* körülmények között vizsgáltuk a 7H3 ellenanyag funkció blokkoló hatását.

4.13.1. 7H3 ellenanyaggal injektált bursa Fabricii fenntartása chorioallantois membrán transzplantáció alkalmazásával

A chorioallantois membrán (CAM) transzplantáció alkalmas technika arra, hogy nagyobb méretű embrionális szerveket hosszabb ideig *in vivo* körülményekhez hasonló miliőben tenyésszünk (Gerhart et al., 2008; Dóra et al., 2017). Kísérletünkben a 7H3 monoklonális ellenanyag funkció blokkoló hatását vizsgáltuk choriallantois-membránra transzplantált, és előzetesen 7H3 ellenanyaggal injektált bursa Fabricii szervkezdeményekben.

A kísérlethez 9 napos csirke embrionális bursa kezdeményeit izoláltuk, amelyeket első lépésben Penicillin/Streptomycin (10 µg/ml, PenStrep, Sigma P0781) tartalmú steril 1xPBS-be helyeztünk. A transzplantáció előtt az izolált bursa Fabricii-ket 0,2µl, 100 µg/ml koncentrációjú, komplett RPMI-1640 médiumban oldott, 7H3 monoklonális ellenanyaggal (n=8) injektáltuk. Az injektáláshoz felhasznált 7H3 monoklonális ellenanyagot előzetesen NAb^{TM} Protein G oszlopok segítségével tisztítottuk, majd protein koncentrációját spektrofotometriás méréssel határoztuk meg (4.8.2 alfejezetben leírtak szerint). Az injektálás előtt vitális festéket, 0,1%-os FastGreen oldatot adtunk az ellenanyaghoz. A FastGreen-nel és komplett RPMI-vel injektált kontroll bursa Fabricii - k (n=6) mellett, egy anti-N-cadherin ellenanyaggal (DSHB, klón 6B3) kezelt negatív kontroll csoportot is alkalmaztunk (George-Weinste et al., 1997), ahol az anti-N-cadherin ellenanyagot 100 µg/ml, komplett RPMI-ben oldva injektáltuk a bursa Fabricius mesenchymájába (n=7). Fontos megjegyezni, hogy a bursai B lymphocyták nem expresszálják a neuronális N-cadherin sejtadhéziós molekulát, így várhatóan nem okoz változást, az egyébként funkció blokkoló hatású anti-N-cadherin ellenanyag jelenléte a bursa Fabricii fejlődésében.

A chorioallantois membrán transzplantáció kezdeti lépéseként, a fogadó csirke tojásokon (E9 stádium) csipesz segítségével kis ablakot nyitottunk a légkamra felett, majd egy csepp Penicillin/Streptomycin tartalmú steril PBS-t cseppentettünk a héjhártyára.

Enyhén megsértve a héjhártyát a steril folyadék bejut a chorioallantois membrán és héjhártya közé, így lehetővé teszi ez utóbbi sérülésmentes eltávolítását. Az így szabaddá tett, gazdagon vaszkularizált chorioallantois membrán felületén kiválasztottunk egy megfelelő ér elágazódási pontot, amelyet papírvatta segítségével traumatizáltunk a graft vaszkularizációjának elősegítése érdekében. Az előzetesen injektált bursa kezdeményt (graft) ráhelyeztük a fogadó (host) embrió traumatizált chorioallantois membrán felületére (egy host embrió/egy graft). A tojáson nyitott ablakot ragasztócsík segítségével leragasztottuk, majd 37°C-on, 70%-os páratartalom mellett a laboratórium keltetőgépeiben további 7 napon keresztül inkubáltuk. Az inkubációs idő eltelte után a graftokat sztereomikroszkóp alatt eltávolítottuk, majd immunhisztokémiai feldolgozáshoz készítettük elő.

4.13.2. *In vitro* B lymphocyta migrációs teszt

Embrionális B lymphocyták tenyésztését és vándorlását 13 napos csirke embriók bursa Fabricii tenyészetén vizsgáltuk. Sejttenyésztő/szövettenyésztő alapmédiumként DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose, Sigma Aldrich, D5671-1L) és RPMI-1640 (Gibco, 61870-037) típusú tápoldatokat használtunk. A szövettenyésztés első lépéseként steril, lamináris fülkében, sztereómikroszkóp alatt izoláltuk az embrionális bursa kezdeményeket, majd a szervet megnyitva, a nyálkahártya redőit steril Moria Pascheff-Wolff rugós olló segítségével eltávolítottuk. A preparálás 1%-os Penicillin/Streptomycin tartalmú (Pen/Strep) RPMI-1640-es médiumban történt. A szövettényésztéshez használt Petri-csészéket előzetesen fibronektinnel előkezeltük (20µg/ml fibronektin (Sigma, fibronectin bovine plasma, F1141) oldat, 1%-os Pen/Strep tartalmú DMEM-ben hígítva, 37°C-on, 30 percig inkubáltuk). A bursai redők preparálását követően a fibronektinnel előkezelt Petri-csészék aljára egy vékony csíkot karcoltunk, a redőket közvetlenül a karcolatra helyeztük, majd komplett RPMI-1640-es médiumban, rövid ideig, szén-dioxid termosztátban inkubáltuk (2 h, 5% CO_2, 37°C, közel 100%-os páratartalom) elősegítve a szövetdarab kitapadását. A letapadást követően az RPMI oldatot lecseréltük a kontroll, valamint a kísérletes csoportoknak megfelelő anyagokat tartalmazó oldatokra. Pozitív kontroll (n=6) esetében a 1%-os Pen/Strep komplett RPMI-1640-es médiumhoz CXCL12 kemoattraktánst (100ng/ml) (Biotechne, recombinant mouse CXCL12/SDF-1 alpha protein, 460-SD-010) adagoltunk. Továbbá két negatív

kontroll csoportot alkalmaztunk: az első esetben 1%-os Pen/Strep komplett RPMI-1640-es médiumot tartalmazó Petri-csészében (n=4), a második esetben pedig médiumhoz adott CXCL12 (100ng/ml) és anti-N-cadherin ellenanyag (9ng/ml) (DSHB, klón: 6B3) együttes jelenléte mellett (n=6) tartottuk az embrionális bursa redőket. Kísérleti csoport (n=7) esetén a médium CXCL12-t (100ng/ml) és tisztított 7H3 monoklonális ellenanyagot (9ng/ml) tartalmazott. A tenyészeteket 24 óra, szén-dioxid termosztátban történt (5% CO_2, 37ºC, közel 100%-os páratartalom) inkubálást követően PFA-ban fixáltuk (2 órán át, szobahőmérsékleten).

Immunhisztokémia előkészítése az *in vitro* migrációs teszt sejtjein

A bursa redőkből kivándorolt sejteken egyszeres immunfluoreszcens festést végeztünk. A használt tenyésztő médiumot leszívtuk és a kivándorolt sejteket 37ºC-on, 1 óráig szárítottuk. A fixálást -20ºC-os, 100%-os methanollal (Lach-Ner, 67-56-1) (10 perc) végeztük, majd szobahőmérsékleten szárítottuk és felhasználásig -20ºC-on, hűtőben tároltuk. Az immunhisztokémiai festést 2x5 perces, 1xPBS-ben történő rehidratálással kezdtük. Az anti-CXCR4 ellenanyaggal történő inkubálást (2 óra, szobahőmérsékleten) követően szekunder ellenanyagot (goat anti-mouse IgG2a 594 1:100) alkalmaztunk (1 óra, szobahőmérsékleten). Végül 3x5 perc, 1xPBS-es mosást követően a sejteket vízoldékony fedőanyaggal lefedtük, és fluoreszcens mikroszkóppal fotóztuk.

Képanalízis és számolás az *in vitro* migrációs teszt fluoreszcens felvételein

A különböző csoportok esetében alkalmazott anyagok sejtmigrációt befolyásoló hatásának jellemzésére statisztikai analízist végeztünk, amelyben figyelembe vettük a kivándorolt sejtek számát és a sejtek bursa redőktől való távolságát. Image J (FIJI) képanalizáló program felhasználásával az embrionális bursa redőkből kivándorolt, fluoreszcensen jelölt CXCR4+ sejteket egymástól elkülönítettük és a bursa redőktől való távolságukat µm-ben megmértük. A kivándorolt sejtek számát és a vándorlás során megtett utat hisztogramon tüntettük fel. Az adatok statisztikai elemzése során Kruskal-Wallis tesztet használtunk, amelyet egy post-hoc Dunn teszt követtet. Az így kapott eredményeken Holm-Bonferroni-korrekciót alkalmaztunk. Az eredményeinket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha $p \leq 0.05$ volt.

5. EREDMÉNYEK

5.1. 7H3 ellenanyaggal jelölt sejtek eloszlásának meghatározása kifejlett gyöngytyúk nyirokszerveiben.

5.1.1. 7H3 antigén expressziós mintázata a gyöngytyúk primer nyirokszerveiben (bursa Fabricii és thymus)

Tudományos kutatási témám kiinduló pontját azok, a laboratóriumunkban hybridoma technikával készült egér monoklonális ellenanyagok adták, amelyeket kifejezetten a madarak lympho-myeloid sejtjeinek karakterizálása céljából hoztunk létre. Ennek a kísérlet sorozatnak az eredményeként számos olyan ellenanyag készült és került publikálásra, amelyek a bursa Fabricii dendritikus sejtjeit (Nagy et al., 2001; Nagy et al., 2004a), FAE sejtjeit (Nagy et al., 2001), lép makrofágokat (Gumati et al., 2003), thrombocytákat (Bódi et al., 2009) vagy a B lymphocytákat (Igyártó et al., 2008) jelölik. Munkám során első lépésben olyan ellenanyagok tesztelését végeztem, amelyek szelektíven a lymphoid sejtvonalat jelölik. A bursa Fabricii lymphocytáit szelektíven felismerő ellenanyagok összehasonlító elemzése alapján, a szakirodalomból még nem ismert immunhisztokémiai mintázatot mutató, 7H3 elnevezésű monoklonális ellenanyag került kiválasztásra.

A 7H3 ellenanyag izotípusát ELISA módszerrel határoztuk meg (IgG_{2b}), majd immunhisztokémiai festési mintázatát felnőtt gyöngytyúk nyirokszerveiben vizsgáltuk. A 10 hetes gyöngytyúk bursa Fabricii follikulusainak kéregállományában a 7H3 ellenanyag elszórtan elhelyezkedő, kerekded morfológiájú sejtekből álló, elkülönült sejtcsoportokat jelölt (7. ábra A). A velőállomány sejtjei nem mutattak pozitív immunreakciót a 7H3 ellenanyaggal.

A 7H3 immunpozitív sejtek karakterizálására első lépésben összehasonlító festéseket végeztünk B és T lymphocyta specifikus markerekkel. A madarak B lymphocytáit általánosan jelölő chB6 ellenanyaggal a bursai follikulusok teljes egésze immunpozitivitást mutatott (7. ábra B). Ehhez hasonló festést adott, a szintén B lymphocytákra jellemző EIVE12 ellenanyag is (7. ábra C). Csirkében az LT2 molekulát, mint a corticalis B lymphocytákra jellemző antigént írták le (Sayegh et al., 2000). Az LT2 ellenanyag a gyöngytyúk bursában a szakirodalmi adatokhoz hasonló módon, a

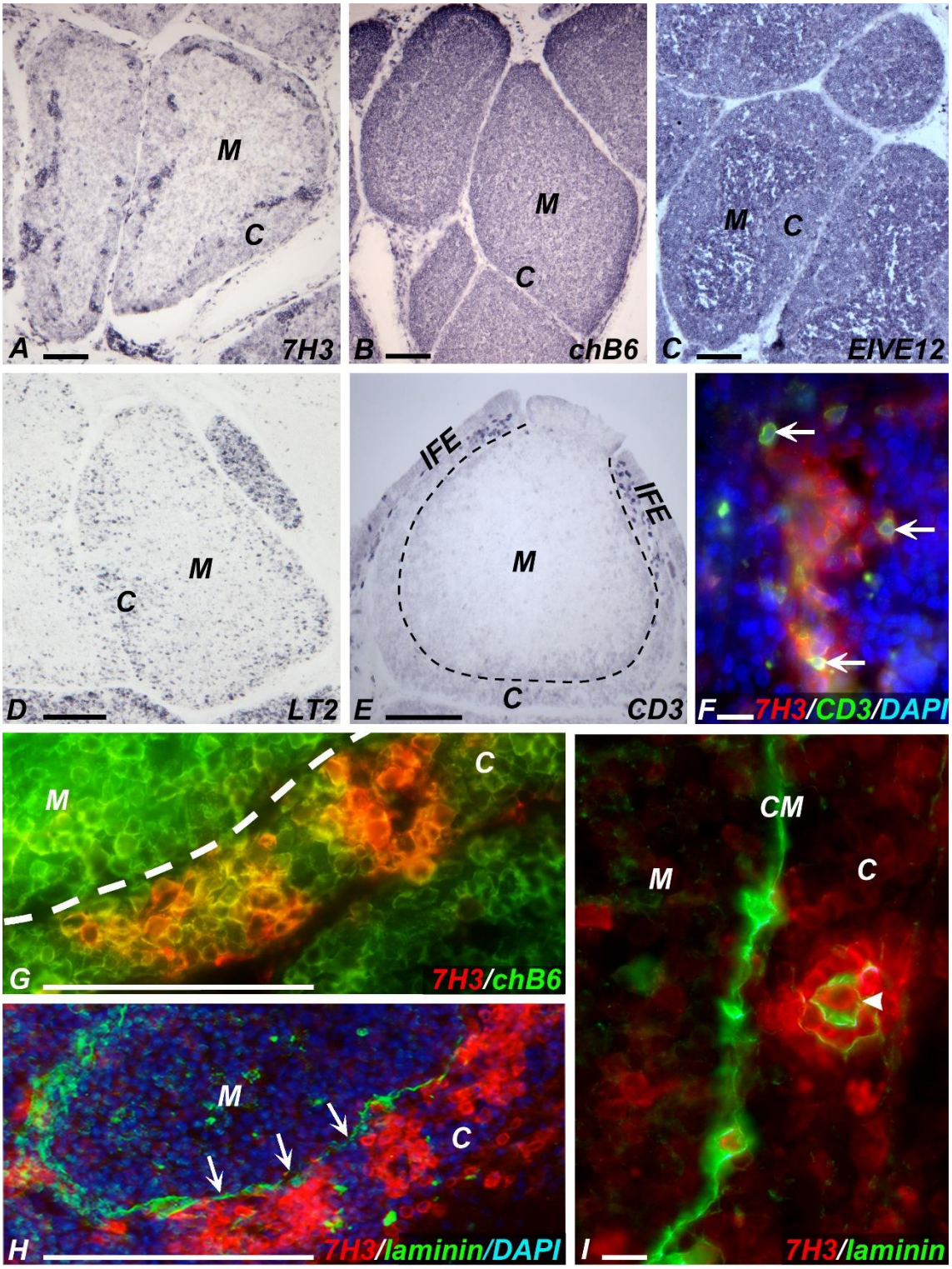
follikulusok kéregállományának sejtjeit jelölte (7. ábra D). Az LT2+ sejtek nem alkottak a 7H3 ellenanyag festésére jellemző sejtcsoportokat, hanem heterogén immunreaktivitást mutatva, a kéreg teljes területén elszórtan fordultak elő.

A T lymphocytákat anti-CD3 ellenanyaggal azonosítottuk, amelyek főleg az interfollikuláris epithelium alatti kötőszövetben lokalizálódtak, de elszórtan a kéregállományban is azonosítottunk egy-egy CD3+ sejtet (7. ábra E).

7H3 és CD3 kettős immunfluoreszcenciát alkalmazva a 7H3+ sejtaggregátumokon belül csak elvétve, egy-két sejt volt 7H3+/CD3+ fenotípusú (7. ábra F). A 7H3+ sejtek többsége a B lymphocytákat jelölő chB6 ellenanyaggal mutatott kolokalizációt (7. ábra G). Ezen immunhisztokémiai festésekkel kapott eredmények azt igazolták, hogy a 7H3+/chB6+ sejtcsoportok a gyöngytyúk bursai B lymphocytáinak egy populációját jelölik.

A 7H3+ sejtek pontos lokalizációjának meghatározására laminin (3H11 klón) és 7H3 ellenanyagokkal kettős immunfluoreszcens festést készítettünk. A laminin festés láthatóvá tette a bursai follikulusok cortico-medulláris határát képező hámsejtek (7. ábra H, I), valamint a kéregállomány kapillárisait bélelő endothel sejtek basalis membránját (7. ábra I). A kettős jelölést követően megfigyeltük, hogy a 7H3 által jelölt B lymphocyták a kéregállomány területén a lamininnal kirajzolt kapillárisok körül lokalizálódnak, illetve az érlumenben is kimutathatóak (7. ábra H, I).

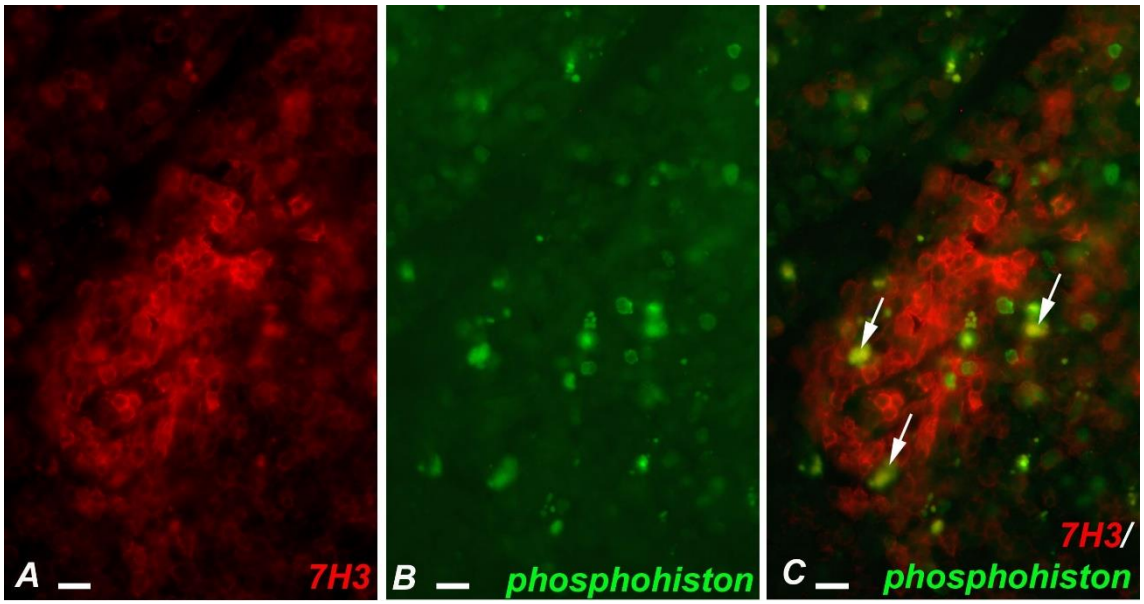
A 7H3+ sejtek csoportos megjelenése alapján felmerült, hogy az ellenanyag intenzíven osztódó B lymphocyta klónokat jelöl. Az osztódó sejtek kimutatásához phosphohiston H3 (G2 és korai telofázisban lévő sejtalakokat jelöli) és 7H3 ellenanyagokkal kettős immunfluoreszcens jelölést végeztünk gyöngytyúk bursa Fabricii-ből készült metszeteken (8. ábra A-C). Az eredmények szerint csak néhány kettős pozitivitást mutató sejt volt azonosítható a bursai follikulusok kéregállományában (8. ábra C).



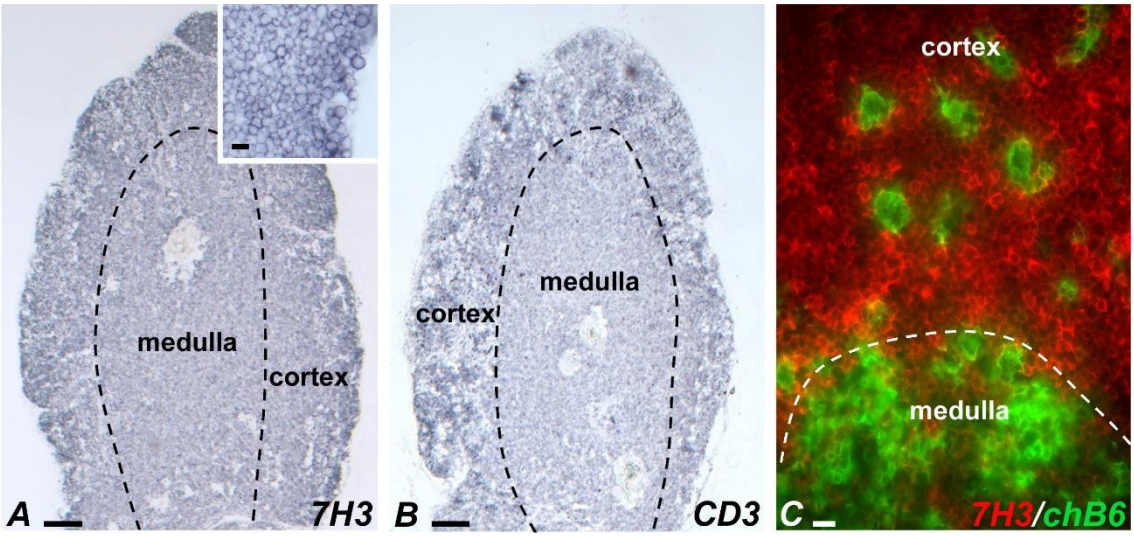
7. ábra: *A 7H3 ellenanyag festési mintázatának összehasonlítása különböző lymphocyta markerekkel, 10 hetes gyöngytyúk bursa Fabricii follikulusaiban.* **A-E)** Kloronaftollal előhívott egyszeres immunjelölés **A)** A 7H3+ sejtek a bursai follikulusok kéregállományában (C: cortex) csoportokban lokalizálódnak, a medulla (M) területe 7H3 negatív. **B) és C)** A bursa cortikális (C) és a medulláris (M) B lymphocytái chB6 és EIVE12 ellenanyagokkal homogén jelölést mutatnak. **D)** LT2 ellenanyaggal a follikulusok kéregállományi (C) területén a B lymphocyták eltérő

intenzítású festődése figyelhető meg. **E)** anti-CD3 ellenanyaggal immunreaktív T lymphocyták az interfollikuláris epithelium (IFE) alatti kötőszövetben figyelhetőek meg; szaggatott vonal: cortico-medullaris határ. **F)** 7H3 (piros) és anti-CD3 (zöld) ellenanyagokkal történő kettős immunfluoreszcens jelölésnél csak néhány sejt mutat kolokalizációt (nyilak), míg **G)** 7H3 (piros) és chB6 (zöld) kettős immunfluoreszcens festés esetén, valamennyi sejt kolokalizál (sárga színű sejtek); szaggatott vonal: cortico-medullaris határ. **H)** Kettős immunfluoreszcens jelölés: laminin (zöld) / 7H3 (piros) / DAPI (kék) magfestés; a laminin festéssel jelölődik a cortico-medulláris (nyílak) határ, valamint az erek basalis membránja. **I)** A cortico-medulláris határ (CM) jelölődik laminin (zöld) festéssel. A kéregállományban (C) a 7H3+ sejtek (piros) a laminin (zöld) által kirajzolt kapilláris basalis membránja (nyílhegy) körül csoportosulnak. Bar: A-F és I: 10 µm; G és H: 100 µm.

A bursa Fabricii-vel szemben, a 7H3 ellenanyag thymusban mutatott festési mintázata megegyezik az anti-CD3 ellenanyag jelölésével (9. ábra A, B). A thymus kéreg- és velőállományának valamennyi T lymphocytája 7H3 pozitivitást mutatott (9. ábra A). A 7H3 ellenanyaggal történő immunjelölés teljesen kirajzolta a lymphocyták kerekded morfológiáját, mivel az immunreakciót kifejezetten a sejtmembránhoz kötötten figyelhettük meg (9. ábra A inset). A thymus velőállományában jelen lévő chB6+ B lymphocyta populáció nem expresszálta a 7H3 ellenanyag által felismert antigént (7H3 antigén) (9. ábra C).



8. ábra*: Osztódó sejtek detektálása immunfluoreszcens jelöléssel, 10 hetes gyöngytyúk bursai follikulusainak kéregállományi 7H3 pozitív sejtcsoportjaiban.* **A)** 7H3 pozitív sejtcsoport a follikulusok kéregállományában. **B)** Phospho-hiszton H3 ellenanyaggal az osztódó sejtek jelölődnek. **C)** 7H3 (piros) és phospho-hiszton H3 (zöld) kettős immunfluoreszcens jelöléssel csak néhány osztódó 7H3+ sejt (nyíllal jelölt, sárga színű sejtek) detektálható. Bar: A-C 100 µm.



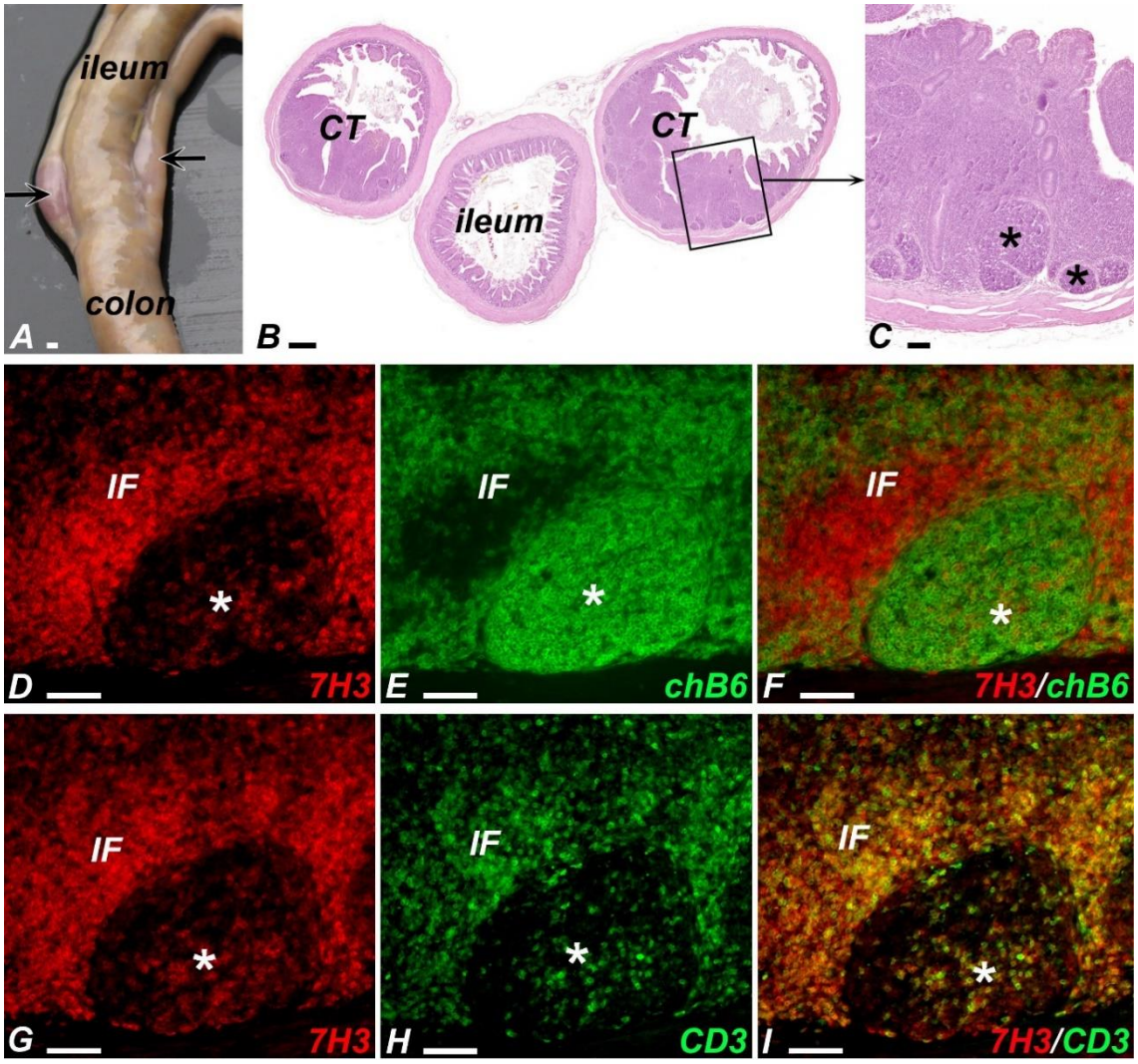
9. ábra: *A 7H3 antigén kifejeződése 6 hetes gyöngytyúk thymus lebenyében.* **A) és B)** Kloronaftolos immunjelölés. **A)** A 7H3 ellenanyag a thymus kéreg- és velőállományi T lymphocytáit egyaránt jelöli; A inset ábra: kéregállományi 7H3+ sejtek kinagyítva. **B)** A CD3 molekula expressziója homogén a kéreg-és velőállományi sejteken. **C)** Kettős immunfluoreszcens festés esetén a 7H3 ellenanyag (piros) nem jelöli a thymusban jelen lévő chB6+ B lymphocytákat (zöld). Bar: A és B: 100 µm; A inset és C: 10 µm.

5.1.2. A 7H3 antigén expressziója kifejlett gyöngytyúk szekunder nyirokszerveiben.

A primer nyirokszervek után a 7H3 ellenanyag tesztelését szekunder nyirokszervekben folytattuk. A szekunder nyirokszerveken (coecalis tonsilla, lép) végzett immunjelölések alapján, 7H3 pozitivitást csak a T dependens területeken tapasztaltunk. Kettős immunfluoreszcenciát alkalmazva a T lymphocytákra jellemző CD3 és a B lymphocytákat jelölő chB6 ellenanyagok alkalmazásával összehasonlítottuk a 7H3 antigén kifejeződését a perifériás szervek lymphocyta populációin.

A coecalis tonsilla a madarak legnagyobb bélhez-asszociált szekunder nyirokszerve. A csiracentrumokat (centrum germinativum) tartalmazó nyirokszövet anti-mesenteriálisan a két coecum bázisánál található (10. ábra A, B) (Nagy et al., 2022). Az emlősökhöz hasonlóan a tunica submucosaban lokalizálódó csíracentrumokat, lymphocytákban gazdag interfollikuláris terület veszi körül (10. ábra B, C). A csíracentrumokban lokalizálódó chB6+ sejtek (10. ábra E) között, elszórtan megfigyeltünk néhány 7H3+ sejtet (10. ábra D, F), amelyek chB6 ellenanyaggal nem jelölődtek, viszont expresszálták a CD3 molekulát (10. ábra I). A 7H3 ellenanyag a csíracentrumok körüli interfollikuláris terület lymphoid sejtjeit jelölte (10. ábra G, I)

hasonlóan, az anti-CD3 T lymphocyta marker festési mintázatához (10. ábra H, I), ellenben az itt lokalizálódó chB6+ B lymphocyták a 7H3 antigént nem expresszálták (10. ábra D-F).



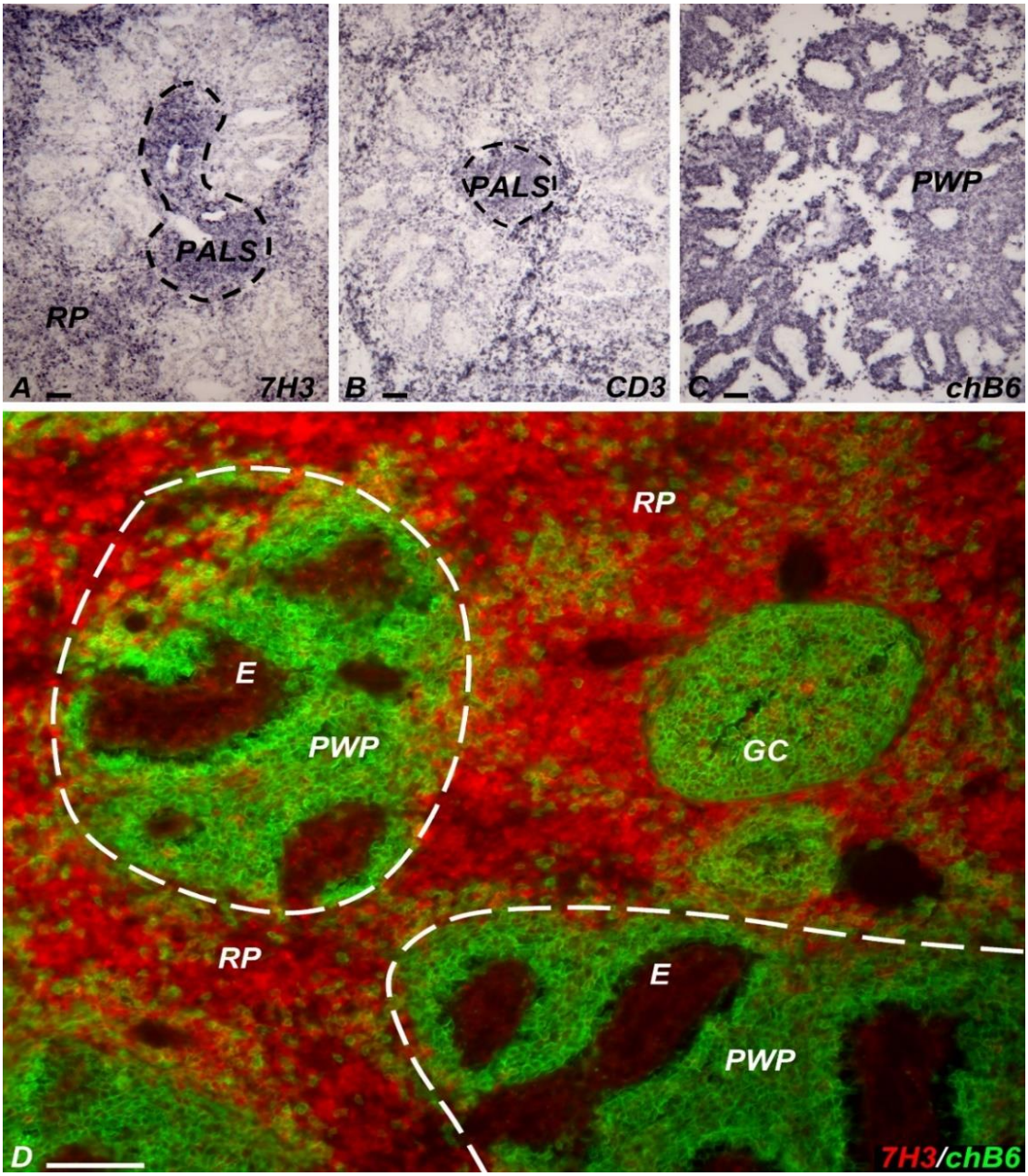
10. ábra: A *7H3 ellenanyag festési mintázata 6 hetes gyöngytyúk coecalis tonsillájában*. **A)** A coecalis tonsilla az ileum és a colon határán, a két coecum bázisánál (nyíl), anti-mesenteriálisan helyezkedik el (sztereomikroszkópos felvétel). **B)** A coecum hematoxilin-eosin (HE) festett keresztmetszeti képén az aszimmetrikusan lokalizálódó coecalis tonsilla (CT) látható. **C)** HE festett metszett nagyított képén a submucosalis csíracentrumok (csillag) figyelhetőek meg. **D-F)** Kettős immunfluoreszcens festés **D)** 7H3 (piros) és **E)** chB6 (zöld) ellenanyagokkal, valamint **F)** kolokalizációs képük. A chB6+ B lymphocytákban gazdag csíracentrum (csillaggal) 7H3 ellenanyaggal nem jelölődik; interfollikuláris régió (IF) **G-I)** Kettős immunfluoreszcens festés **G)** 7H3 (piros) és **H)** anti-CD3 (zöld) ellenanyagokkal, valamint **I)** kolokalizációs képük. A T lymphocytákban gazdag CD3+ interfollikuláris régióban a 7H3 ellenanyag is pozitív immunreakciót ad. Bar: A és B: 1000 µm; C-I: 100 µm.

A madarak lépe, akárcsak az emlősöké, fehér és vörös pulpára tagolódik. A fehér pulpát a B dependens csíracentrumok, az ecsetkapillárisokat behüvelyező ellipsoidok, az őket körülvevő, B lymphocytákban gazdag periellipsoidális fehérállomány (periellipsoid white pulp, PWP), és a T dependens periarterioláris lymphoid hüvely (periarterial lymphatic sheath, PALS) alkotja (Nagy et al., 2022). A 7H3 ellenanyaggal intenzív immunreakciót kaptunk a vörös pulpa és a PALS területén (11. ábra A, D). Ez a mintázat nagyon hasonlított az anti-CD3 ellenanyaggal kapott immunhisztokémiai képhez (11. ábra B). A 7H3+/CD3+ területektől élesen elkülönültek a chB6+ B dependens csíracentrumok és a periellipsoidális fehérállomány (11. ábra C, D).

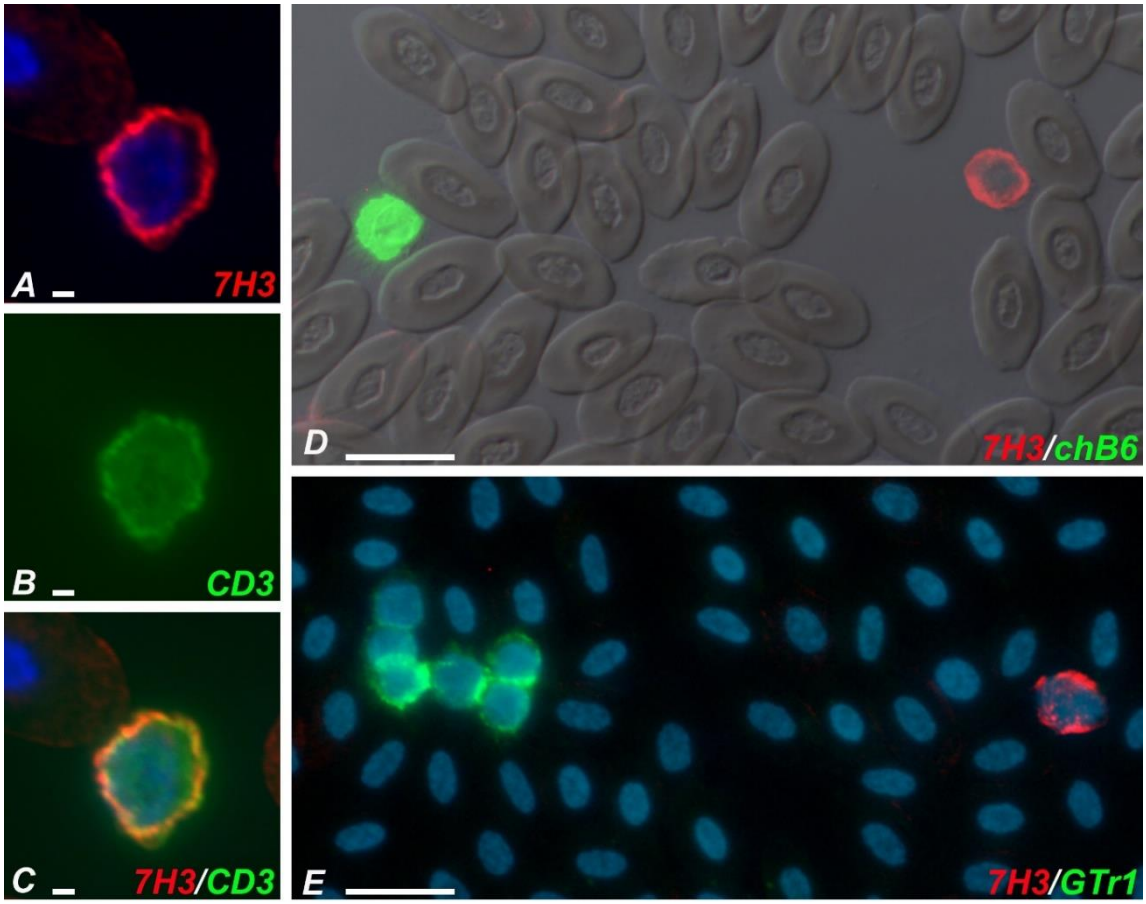
Vérkeneten kettős immunfestéseket készítettünk, a perifériás keringésben előforduló 7H3+ sejtek karakterizálása érdekében. A madarak sejtmaggal rendelkező thrombocytáinak jelölésére egy szintén laboratóriumunkban készült, gyöngytyúk specifikus monoklonális ellenanyagot, a GTr1-et alkalmaztuk (Bódi et al., 2009). A különböző granulocyták jelölésére sajnos nem állt rendelkezésünkre gyöngytyúkon is keresztreakciót mutató ellenanyag, de erősen lebenyezett sejtmagjuk alapján, DAPI magfestéssel könnyen elkülöníthetőek voltak a vér többi alakos elemétől. A lymphocyták jelölésére anti-CD3 és chB6 ellenanyagokat használtunk. A kettős immunjelölések során a 7H3 ellenanyag kerekded morfológiájú, mononukleáris sejteket festett gyűrűszerűen (12. ábra A), amelyek kolokalizációt mutattak az anti-CD3 ellenanyaggal is (12. ábra B, C). A hasonló méretű és morfológiájú chB6+ B lymphocytákat (12. ábra D), a csoportosan megjelenő thrombocytákat (12. ábra E) és a lebenyezett sejtmagvú granulocytákat nem jelölte a 7H3 ellenanyag.

Megemlítendő, hogy a thymus, lép és bélhez asszociált nyirokszerveken kívül, például a vese és a tüdő szövettani metszetén az erek lumenében, valamint az interstitiumban diffúzan lokalizálódó, a központi idegrendszerben csakis az erek lumenében megfigyelhető, kevés, kerek morfológiájú 7H3+ sejtet detektáltunk.

Összefoglalás: A felnőtt gyöngytyúk nyirokszervein végzett immunfestésekkel kapott eredményeink szerint a 7H3 monoklonális ellenanyag valamennyi T lymphocytára, valamint a bursai B lymphocyták egy kéregállományi alpopulációjára specifikus marker, mely kifejezetten sejtfelszíni membrán jelölést ad.



11. ábra: *A 7H3 ellenanyag festési mintázata 6 hetes gyöngytyúk lépében.* **A)** 7H3; **B)** anti-CD3; és **C)** chB6 ellenanyagokkal történt egyszeres immunjelölés kloronaftollal előhívva. **A)** A 7H3+ sejtek **B)** az anti-CD3 ellenanyag festési mintázatához hasonlóan, a lép T dependens periarterioláris lymphoid hüvely (PALS) területén (szaggatott vonal) és a vörös pulpában (RP) lokalizálódnak. **C)** A chB6+ B dependens periellipszoidális fehérállomány (PWP) képe, amely az ecsetkapillárisok körül elhelyezkedő chB6 negatív ellipsoidokat fogja körül **D)** A kettős immunfluoreszcens festés 7H3 (piros) és chB6 (zöld) ellenanyagokkal mutatja, hogy a 7H3+ sejtek a lép B dependens periellipszoidális fehérállományban (PWP), a csíracentrumaiban (GC), valamint a chB6- ellopsoidok (E) területén nem fordulnak elő. Bar: A-D: 100 µm.



12. ábra: *10 hetes gyöngytyúk vérkenet kettős immunfluoreszcens jelöléssel.* **A)** 7H3 ellenanyag (piros) és DAPI (kék). **B)** anti-CD3 ellenanyag (zöld). **C)** 7H3 (piros) és anti-CD3 (zöld) ellenanyagok, valamint DAPI magfestés (kék). **D)** 7H3 (piros) és chB6 (zöld) ellenanyagok. **E)** 7H3 (piros), GTr1 (zöld) ellenanyagok és DAPI magfestés (kék) kimutatása fluoreszcens mikroszkóppal. **A-C)** A 7H3 ellenanyag lymphocytákra jellemző, kerekded morfológiájú sejteket gyűrűszerűen jelöl, amelyek egyben CD3 pozitívak is. **D)** A hasonló méretű chB6+ B lymphocytákat (zöld) és **E)** a csoportosan megjelenő GTr1+ thrombocytákat (zöld) a 7H3 (piros) ellenanyag nem jelöli. Bar: A-C: 1 µm; D és E: 10 µm.

5.2. 7H3 pozitív sejtek vizsgálata a gyöngytyúkok embrionális fejlődése során

5.2.1. A 7H3 pozitív sejtek megjelenése a korai gyöngytyúk embrióban

A 7H3 ellenanyag által felismert antigén további karakterizálása során megvizsgáltuk a korai embrionális stádiumokban történő megjelenését is. Az embrionális fejlődés során az első 7H3+ sejteket 2 napos, Hamburger-Hamilton (HH) beosztás szerint 12. stádiumú embrió szikhólyagjában figyeltük meg (13. ábra A). A halvány immunpozitivitást mutató, kerekded morfológiával rendelkező 7H3+ sejtek az extraembrionális vérszigetekben kis számban fordultak elő.

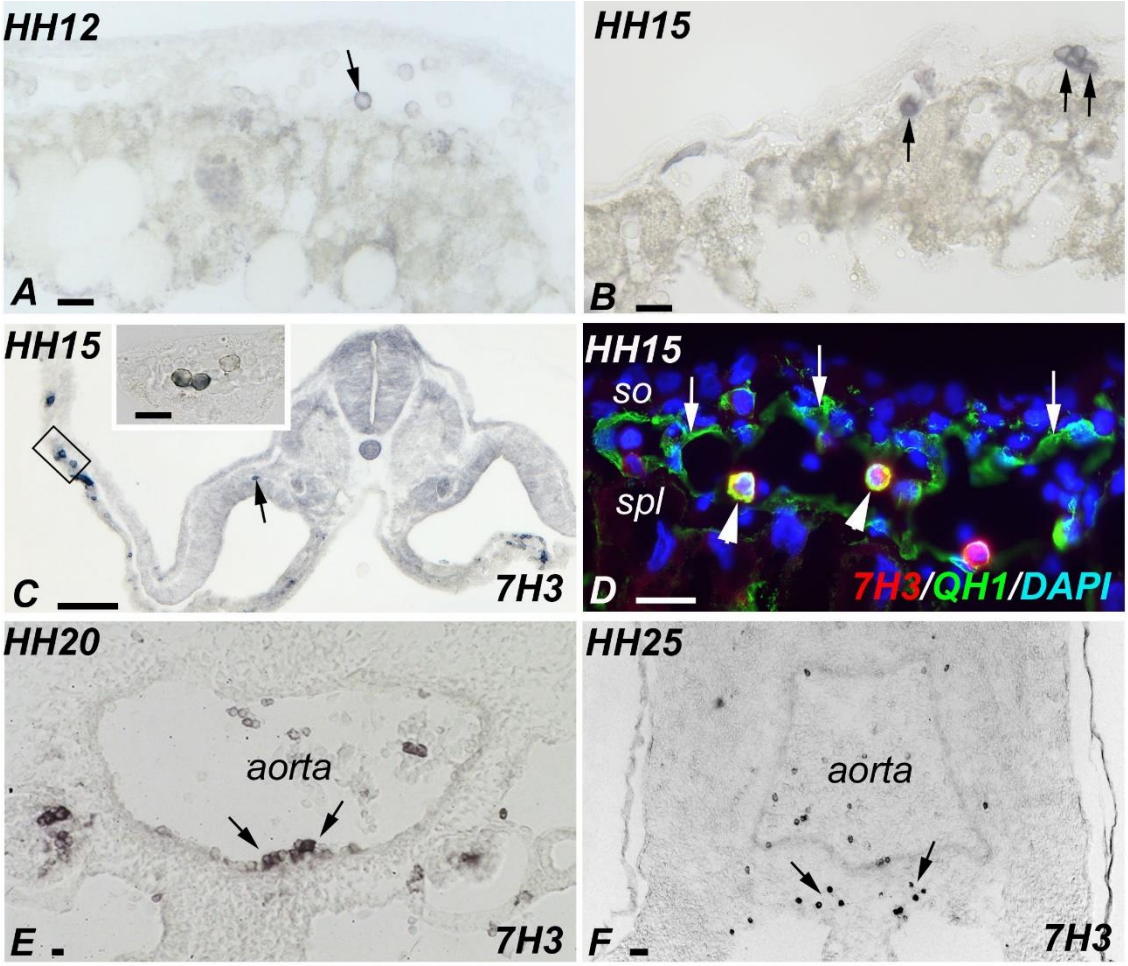
Fél nappal később (HH15-ös stádium), a szikhólyag vérszigeteiben megjelenő, kerekded 7H3+ sejtek önállóan vagy kis csoportokat alkotva egymáshoz, valamint a fejlődő erek endothelium borításához asszociáltan lokalizálódtak (13. ábra B). Ugyan ebben a stádiumban már az intraembrionális mesodermában is azonosítottunk néhány 7H3 pozitivitást mutató sejtet (13. ábra C). A korai megjelenés, a sejtek lokalizációja és morfológiája hematopoietikus eredetre utalt. Ennek bizonyítására kettős jelölést alkalmaztunk a QH1 ellenanyaggal, amely egy fürj specifikus, korai hematopoietikus sejteket, valamint endothelt jelölő marker (Pardanaud et al., 1987). A QH1 ellenanyag keresztreagált gyöngytyúkkal is, ahol a QH1 kirajzolta a fejlődő szikhólyagi erek endotheliumát és egyben jelölte a szomszédságában lévő 7H3+ sejteket is (13. ábra D).

A 7H3 antigén hematopoietikus sejtekre jellemző expresszióját későbbi stádiumokban, az intraembrionális vérképző helyeken és a fejlődő primer nyirokszervekben is nyomon követtük. A csirke és fürj embriókban megfigyelt intraembrionális vérképzés a harmadik embrionális nap után veszi kezdetét (Jaffredo et al., 1998; Dieterlen-Lièvre et al., 2006; Dóra et al., 2017). A páros aorta fúzióját követően, a ventrális falat alkotó hemogenikus endotheliumból burjánzással képződnek az intra-aortikus sejt aggregatumok (intra-aorticus hematopoietikus redő, intraaortic hematopoietic cluster = IAHC). Génexpressziós és funkcionális adatok alapján, az aorta IAHC sejtjei adják a felnőttkori vérképzés progenitor sejtjeit (Orkin & Zon, 2008).

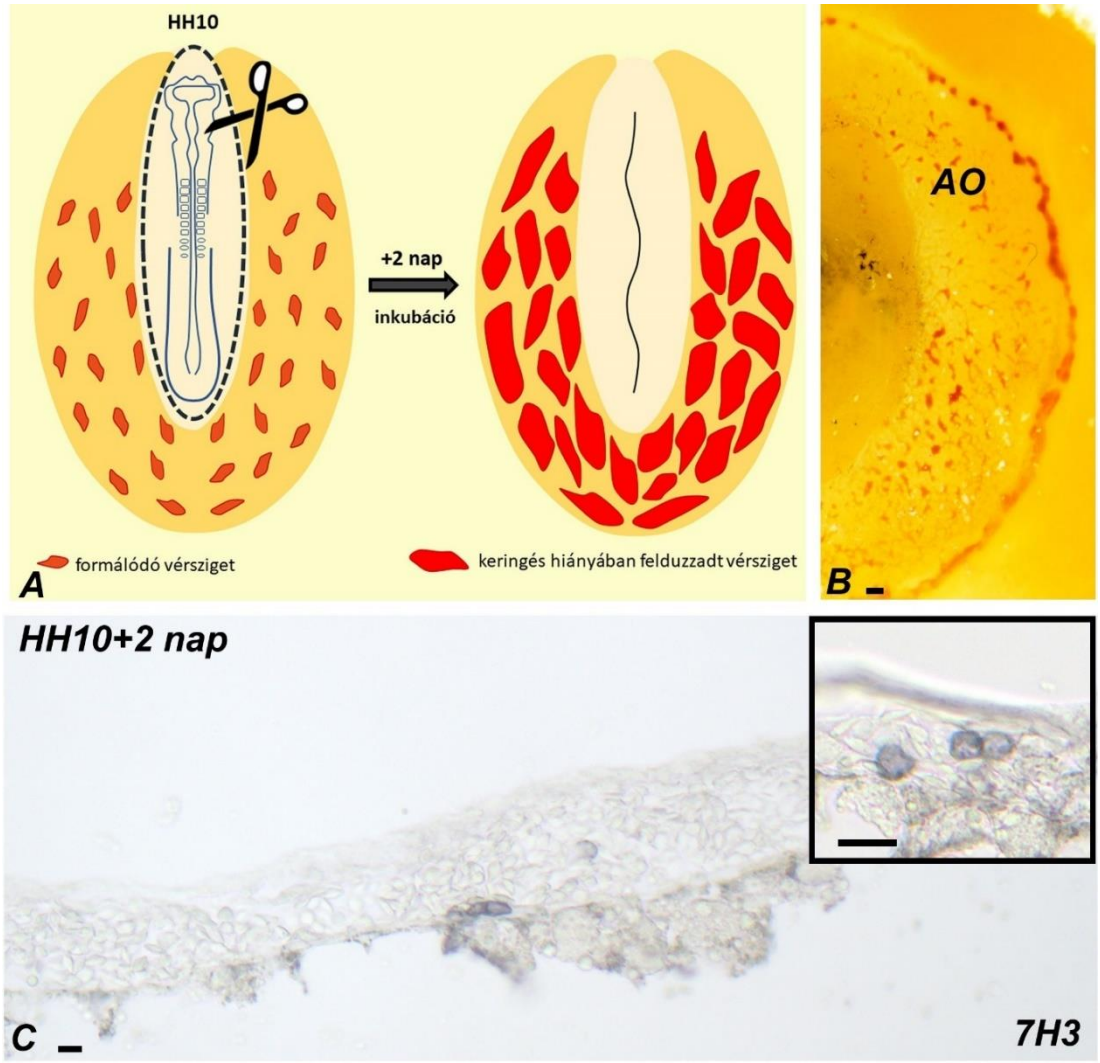
Intraembrionálisan, 3 napos gyöngytyúk embrió (HH19) aortájának ventrális falában megjelenő intra-aortikus hematopoietikus redőben detektáltunk további 7H3 pozitív sejteket (13. ábra E). Fontos kiemelni, hogy a csirkében leírt, páros IAHC-től eltérő módon a gyöngytyúk embrióban egyetlen, az aorta ventrális oldalán, szélesebb sávban végig húzódó intra-aortikus hematopoietikus redőt figyeltünk meg (13. ábra E). Későbbi HH25-ös stádiumban 7H3+ sejteket azonosítottunk a para-aortikus régióban (13. ábra F).

A 7H3+ sejtek képződését a szikhólyag vérszigeteiben kísérletesen is igazoltuk (14. ábra A-C). A keringéssel még nem rendelkező, HH10-es stádiumú embriók *in ovo* mikrosebészeti eltávolításával, izoláltan lehet a szikhólyagot tenyészteni (Dóra et al., 2017). Ezzel a kísérleti technikával, amelynek részleteit Dr. Dóra Dávid munkatársammal közösen fejlesztettük ki, lehetőségünk nyílt az extraembrionális differenciálódó vérsejtek *in situ* vizsgálatára.

A HH10-es stádiumú gyöngytyúk embrió mikrosebészeti eltávolítása (14. ábra A) után két nappal, a tovább fejlődő szikhólyagban számos, keringés hiányában nagyméretűre felduzzadt vérszigetet detektáltunk (14. ábra A, B). A vérszigetekben elszórtan, kis számú, kerekded morfológiájú 7H3+ sejtet azonosítottunk (14. ábra C).



13. ábra: *A 7H3 antigén megjelenése korai gyöngytyúk embrióban.* **A-C)** Kloronaftollal előhívott egyszeres immunjelölés **A)** A 7H3 ellenanyaggal 38-45 órás embrió szikhólyagjában elsőként pozitivitást mutató, kerekded morfológiájú sejt (nyíl). **B-D)** HH15-ös stádiumú embrió. **B)** Extraembrionálisan, a szikhólyag területén a 7H3+ sejtek egyesével (↑) vagy endothelhez asszociáltan csoportosan (↑↑) láthatóak. **C)** Intraembrionálisan is megjelenő 7H3+ sejtek detektálhatóak (nyíl). Körülrajzolt terület (inset): extraembrionális vérsziget kinagyítva. **D)** Kettős immunfluoreszcens festés 7H3 (piros), QH1 (zöld) ellenanyagokkal és DAPI (kék) magfestékkel. A kettősen jelölt, QH1+/7H3+ kerekded sejtek (nyílhegy) a QH1+/7H3- vérsziget endothel sejtjeinek (nyíl) szomszédságában lokalizálódtak (spl: splanchnopleura; so: somatopleura). **E) és F)** Kloronaftollal előhívott egyszeres immunjelölés. **E)** A 3 napos (HH20) embrióban 7H3 ellenanyag által jelölt sejtek az intra-aortikus redőben (nyilak), majd **F)** egy nappal később (HH25), a dorsalis mesenterium para-aortikus mesenchymában (nyilak) fordultak elő. Bar: A, B, C inset, D, E, F: 10 µm; C: 100 µm.



14. ábra: *A 7H3+ sejtek extraembrionális képződésének bizonyítása szikhólyag in ovo tenyésztésével.* **A)** A mikromanipuláció sémás ábrázolása: a keringés megindulása előtt, a HH10-es stádiumú gyöngytyúk embriót iridektómiás ollóval kimetsszük, majd a visszamaradt szikhólyagot a tojásban hagyva, további 2 napot inkubáljuk (*saját készítésű ábra*). **B)** Az inkubációs idő eltelte után, keringés hiányában megduzzadt vérszigetek fejlődtek ki az area opaca (AO) területén. **C)** Kloronaftolos immunjelölést követően a megnagyobbodott vérszigeten belül 7H3+, kerekded sejtek láthatóak a vér egyéb alakos elemi között. Kinagyított képrészlet (inset): kerekded morfológiájú, 7H3+ sejtek. Bar: B: 1000 µm; C és inset: 10 µm.

Összefoglalás: A QH1 ellenanyaggal történő immunhisztokémiai festések, valamint az embrió ablációs kísérlet azt igazolja, hogy a 7H3 antigén extraembrionálisan keletkező vérképző őssejteken expresszálódik először, majd a fejlődés későbbi stádiumaiban az intraembrionális vérképző helyek hematopoietikus sejtjei is kifejezik.

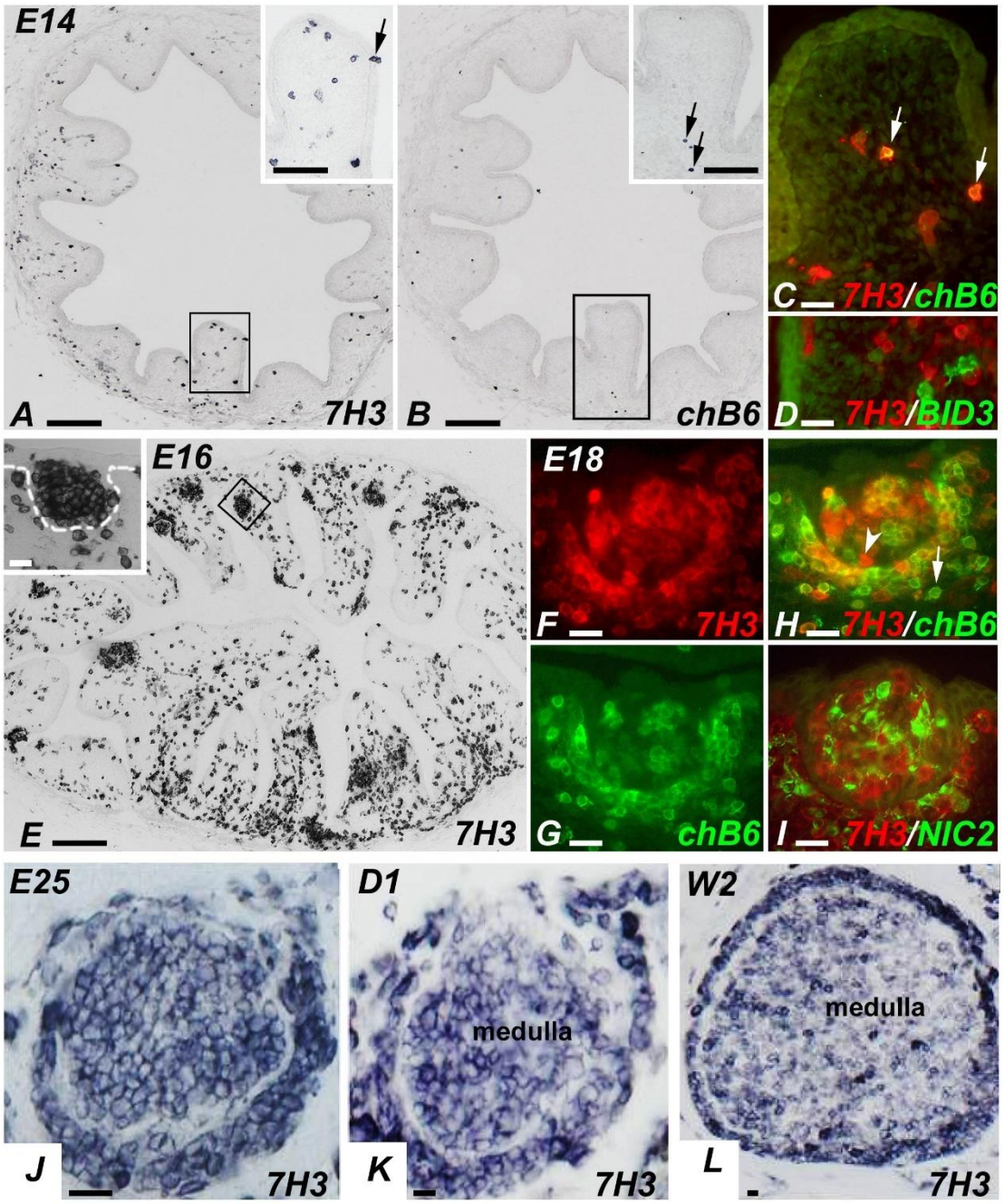
5.2.2. A 7H3 antigén expressziója a gyöngytyúk bursa Fabricii fejlődése során

A bursa Fabricii ontogenezise során a 7H3+ sejtek eloszlását összehasonlítottuk a chB6+ B lymphocyták (Igyártó et al., 2008), a BID3+ makrofágok (Gumati et al., 2003) és az NIC2+ BSDC-k (Nagy et al., 2001) megjelenésével. Gyöngytyúkban a bursa Fabricii a 12. embrionális napon (E12) hámtelepből és az azt körülvevő mesenchymából áll (Nagy et al., 2001), amelyben megjelennek a szervet kolonizáló vérképző őssejtek. Az első 7H3+ sejtek kis számban az E12-es stádiumtól kimutathatóak a bursa mesenchymájában, megelőzve a chB6+ B lymphocyta prekurzorok (prebursalis B lymphocyták) bevándorlását.

A 14. embrionális napon (E14) nagyszámú 7H3+ sejt lokalizálódott a fejlődő redők mesenchymájában, és néhány sejt a felszíni epitheliumot is kolonizálta (15. ábra A). Ezzel egyidőben a bursa primordium mesenchymája a felszíni hámborítástól távol elhelyezkedő chB6+ (15. ábra B, C) és BID3+ (15. ábra D) sejteket is tartalmazott. Kettős immunfluoreszcens jelöléssel kimutattuk, hogy a szervet kolonizáló chB6+ B lymphocyta prekurzorok kifejezik a 7H3 antigént (15. ábra C), míg a BID3+ makrofágok nem jelölődnek a 7H3 ellenanyaggal (15. ábra D). A 16. embrionális naptól kezdve már megfigyeltünk néhány fejlődő follikulus bimbót, amely nagyszámú 7H3+ sejtet tartalmazott. Ezzel párhuzamosan a redők tengelyében további számos 7H3+ sejt volt jelen (15. ábra E). A 18 napos embrió bursájában már számos follikulus bimbó azonosítható, amelyeket kitöltő chB6+ B lymphocyták nagy része expresszálja a 7H3 antigént, habár elszórtan találtunk 7H3+/chB6- vagy 7H3-/chB6+ fenotípusú sejteket is (15. ábra F-H). E18-as stádiumban a B lymphocyták mellett számos, a myeloid sejtvonalhoz tartozó NIC2+ BSDC is jelen van a follikulus bimbókban, amelyek nem mutattak kolokalizációt a 7H3 ellenanyaggal (15. ábra I). A kikelésig és az azt követő pár napig a bimbókat kitöltő B lymphocyták egyenletesen fejezik ki a 7H3 antigént (15. ábra J, K). A kikelést követő második héttől a velőállományi B lymphocyták 7H3 immunpozitivitása csökkeni kezd (15. ábra L), majd a 10. hétre az antigén kifejeződése (a 5.1.1. fejezetben taglalt módon) a kéregállomány izolált sejtcsoportjaira korlátozódik.

Összefoglalás: A különböző embrionális stádiumú bursa Fabricii-n végzett immunhisztokémiai festések szerint a primer nyirokszervet kolonizáló B lymphocyta prekurzorok (prebursalis B lymphocyták) már kifejezik a 7H3 antigént, amelynek expressziója valamennyi, embrionálisan differenciálódó bursai B lymphocytára jellemző.

Kikelést követően a velő-, majd a kéregállományi B lymphocyták 7H3 antigénjének kifejeződése fokozatosan csökken. Ez alól kivételt képez a kéregállományi B lymphocyták egy alpopulációja.



15. ábra: *7H3 pozitív sejtek vizsgálata a gyöngytyúk bursa Fabricii ontogenezise során.* **A-D)** 14 napos embrió (E14) bursa Fabricii-e. **A) és B)** Kloronaftolosan előhívott egyszeres immunjelölés **A)** E14-es stádiumú embrió bursa mesenchymáját 7H3+ sejtek kolonizálják. Ebben a stádiumban néhány 7H3+ sejt belép a felszínt borító hámrétegbe is. Körülrajzolt terület kinagyítva látható (inset). A nyíl intraepitheliális helyzetű 7H3+ sejtekre mutat. **B)** Elszórtan chB6+ B lymphocyták

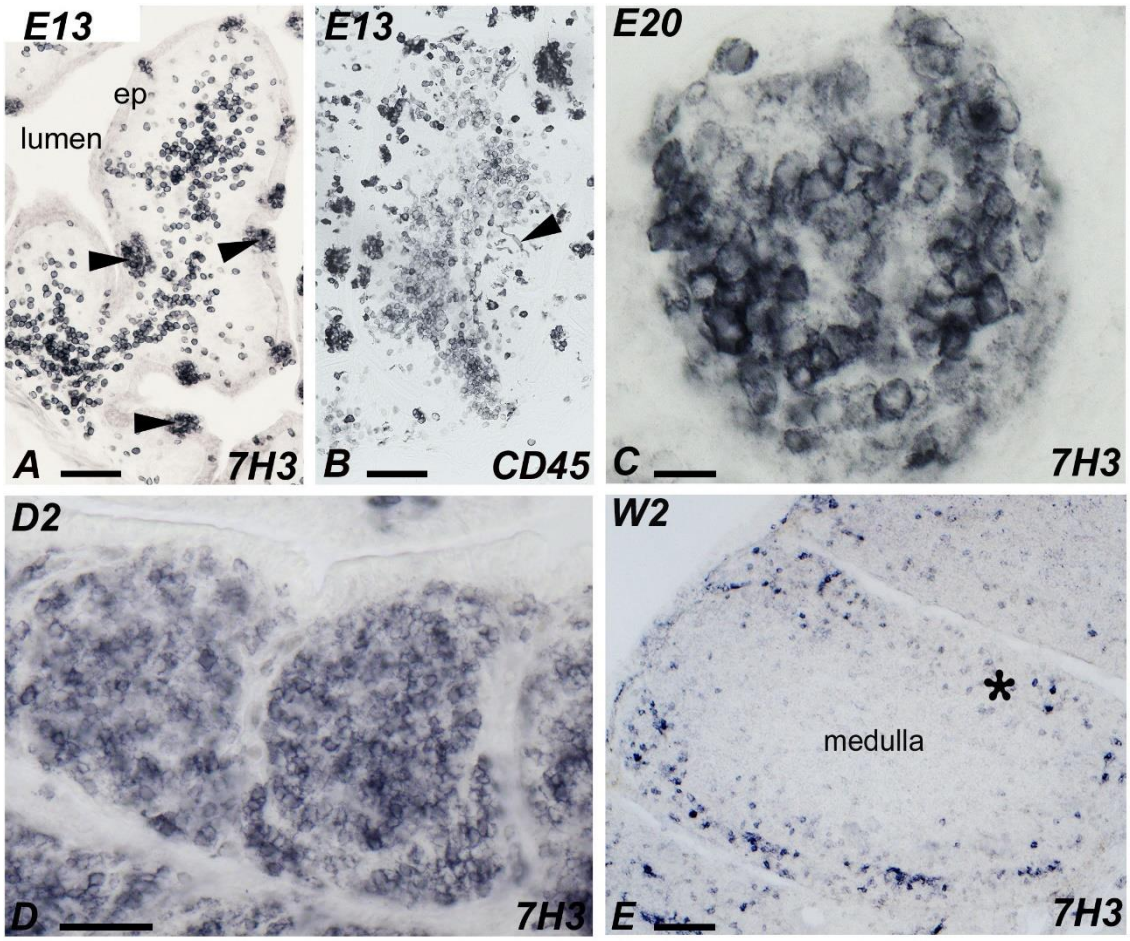
jelennek meg a bursa mesenchymájában; körülrajzolt terület kinagyítva látható (inset), a nyilak a redők tengelyében lokalizálódó chB6+ sejtekre mutatnak. **C)** Kettős immunjelölés során a 7H3 pozitivás (piros) átfed a chB6 pozitivitást (zöld) mutató B lymphocyta prekurzor sejtekben. **D)** BID3+ monocyta/makrofág (zöld) sejtek a 7H3 ellenanyaggal (piros) nem jelölődnek. **E)** Kloronaftolos immunjelölés: két nappal később (E16), a kialakuló follikulus bimbókat kolonizálják a 7H3+ sejtek. Kinagyított képrészlet (inset): follikulus bimbó; a szaggatott vonal a hám alatti basalis membránt jelöli. **F-I)** 18 napos embrionális bursa follikulusok (E18). **F-H)** Kettős immunjelölést követően chB6 (zöld) és 7H3 (piros) ellenanyagokkal, a B lymphocyták többsége expresszálja a 7H3 antigént (sárga színű sejtek). Néhány sejt chB6+/7H3- (nyíl) vagy chB6-/7H3+ (nyílhegy) fenotípusú. **I)** N1C2+ (zöld) dendritikus sejt jelölés nem kolokalizál a 7H3 ellenanyaggal. **J-L)** Kloronaftolosan előhívott egyszeres immunjelölés, a bursa kikelés környéki, különböző fejlődési stádiumaiban. **J, K)** Közvetlenül a kikelés előtt (E25) és után 1 nappal (D1) a 7H3 ellenanyag valamennyi B lymphocytát jelöli. **L)** Két hetes korban (W2) a cortikális B lymphocyták intenzíven festődnek, míg a velőállományban a sejtek 7H3 pozitivitása fokozatosan csökken. Bar: A, B, E: 100 µm; A inset, B inset: 50 µm; C, D és F-L: 10 µm.

5.3. 7H3 antigén expressziója csirke bursa Fabricii-ben

Fürj, csirke, liba, valamint emlősök közül egér és hörcsög nyirokszervein végzett immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a 7H3 ellenanyaggal csak a csirke szövetein azonosítottunk fajok közötti kereszt-reaktivitását. Következő lépésként összehasonlítottuk a 7H3 ellenanyag különböző korú csirke bursa Fabricii-ben mutatott festési mintázatait a gyöngytyúk bursa Fabricii-nek organogenezise során megfigyelt eddigi eredményeinkkel.

A 7H3 antigén csirke bursa Fabricii-ben mutatott expressziós mintázata mind embrionálisan, mind a kikelés utáni stádiumokban nagyon hasonló képet mutatott a gyöngytyúkban megfigyelt mintázattal (16. ábra A-E). E13-as stádiumban számos, jól definiált follikulus bimbó nagy számú, kerek morfológiájú 7H3 pozitív sejtet tartalmazott (16. ábra A). Az anti-CD45 ellenanyag festési mintázata hasonló volt a 7H3-hoz, kivéve a bursa redők tengelyében elhelyezkedő CD45+ nyúlványos sejteken, mivel 7H3 pozitivitás kizárólag a kerekded morfológiát mutató, mesenchymában lokalizálódó sejteken detektáltunk (16. ábra B). Kikelés előtt (E20) a follikulus bimbók valamennyi B lymphocytája 7H3 pozitívnak bizonyult (16. ábra C), míg az erythrocyták és a nyúlványos myeloid sejtek negatívak voltak. Kikelést követően a follikuláris B lymphocyták 7H3 pozitivitásának lecsengése hasonló módon történik, mint a gyöngytyúk bursa Fabricii follikulusaiban. A velőállományi B lymphocyták lesznek először negatívak (16. ábra D), viszont időben gyorsabban zajlik a folyamat. A csirke

kikelését követő második hét végére csakis a kéregállományi sejtcsoportok jelölődnek 7H3 ellenanyaggal (16. ábra E).



16. ábra: *7H3 ellenanyag keresztreakciója csirke bursa Fabricii-ben.* **A-E)** Kloronaftolosan előhívott egyszeres immunjelölés. **A)** 13 napos csirke embrió (E13) bursa Fabricii fejlődő follikulusait (nyílhegy) 7H3+ sejtek töltik ki. Nagyszámú, kerekded morfológiájú, 7H3+ sejt detektálható a redők tengelyében és a felszíni hámhoz asszociáltan. **B)** Az anti-CD45 ellenanyag jelölése megegyezik a 7H3 ellenanyagéval, kivételt képez a redők tengelyében található nyúlványos sejtpopuláció (nyílhegy). **C)** A kikelést megelőző napon (E20) valamint **D)** két nappal a kelés után (D2) a follikulus bimbók szinte valamennyi sejtje expresszálja a 7H3 antigént. **E)** 2 hetes kikelt (W2) csirke 7H3 antigént expresszáló bursalis sejtjei a follikulusok kéregállományban (*) figyelhetőek meg. Bar: A, B, D és E: 50 µm; C: 10 µm.

5.4. A 7H3 antigén és a CXCR4 receptor expressziós mintázatának összehasonlítása gyöngytyúk és csirke bursa Fabricii-ben

5.4.1. Gyöngytyúk és csirke CXCR4 receptor expressziós mintázatának összehasonlítása a bursalis B lymphocytákon

Emlősökben a CXCR4 kemokin receptor és ligandja, a stromális sejtek által termelt CXCL12 (más néven: SDF-1) fontos szerepet tölt be a lymphoid sejtek migrációs folyamataiban, valamint a B lymphocyta prekurzorok csontvelőn belüli homeosztázisában (Nagasawa, 1996, Nagasawa, 2014; Mcheik et al., 2019; Medeiros et al., 2021). Beck és munkatársai kimutatták, hogy a csontvelői B lymphocyta prekurzorok CXCR4 receptorának expressziós mértéke időben változik, meghatározva a sejtek csontvelőn belüli lokalizációját, illetve a perifériás keringésbe történő kilépését (Beck et al., 2014). Egy nemrégen csirkén végzett tanulmányban igazolták, hogy a bursalis B lymphocyták szintén kifejezik a CXCR4 receptort, amelynek fontos szerepe lehet a bursa Fabricii kolonizációs folyamataiban (Ko et al., 2018).

Kollaborációban a müncheni Ludwig-Maximilians Universität Állatorvosi Karának Komparatív Immunológiai kutatócsoportjával csirke állatmodellen vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a CXCR4/CXCL12 jelátvitel a bursai B lymphocyták fejlődését. A kollaborátorunktól kapott új, anti-CXCR4 ellenanyag tesztelését laboratóriumunkban végeztük. Így a CXCR4 receptor expressziós mintázatát immunhisztokémiai festésekkel vizsgáltuk és a csirke bursa Fabricii mellett, különböző korú gyöngytyúk bursából készült mintákon is tanulmányoztuk.

10 hetes gyöngytyúk bursa Fabricii-ből készült metszeteken a CXCR4 receptor expressziója kifejezetten a follikulusok széli régiójában figyelhető meg (17. ábra A). Ez a festési mintázat teljesen megegyezik a 6 hetes csirkében látott mintázattal (17. ábra B). Anti-cytokeratin ellenanyag alkalmazásával a velőállomány retikuláris epitheliuma, valamint a cortico-medulláris határt alkotó epithel sejtréteg elkülöníthető a cytokeratin negatív kéregállományi mesenchyma sejtektől csirke bursaban (17. ábra C). A csirke bursa Fabricii metszetein anti-cytokeratin és anti-CXCR4 kettős immunfestés szerint kifejezetten erős CXCR4 pozitivitás jellemző a follikulusok kéregállományi területére (17. ábra D). További kettős immunfluoreszcens jelöléssel kimutattuk, hogy a csirke kéregállományi chB6+ B lymphocytái kifejezik a CXCR4 receptort, viszont

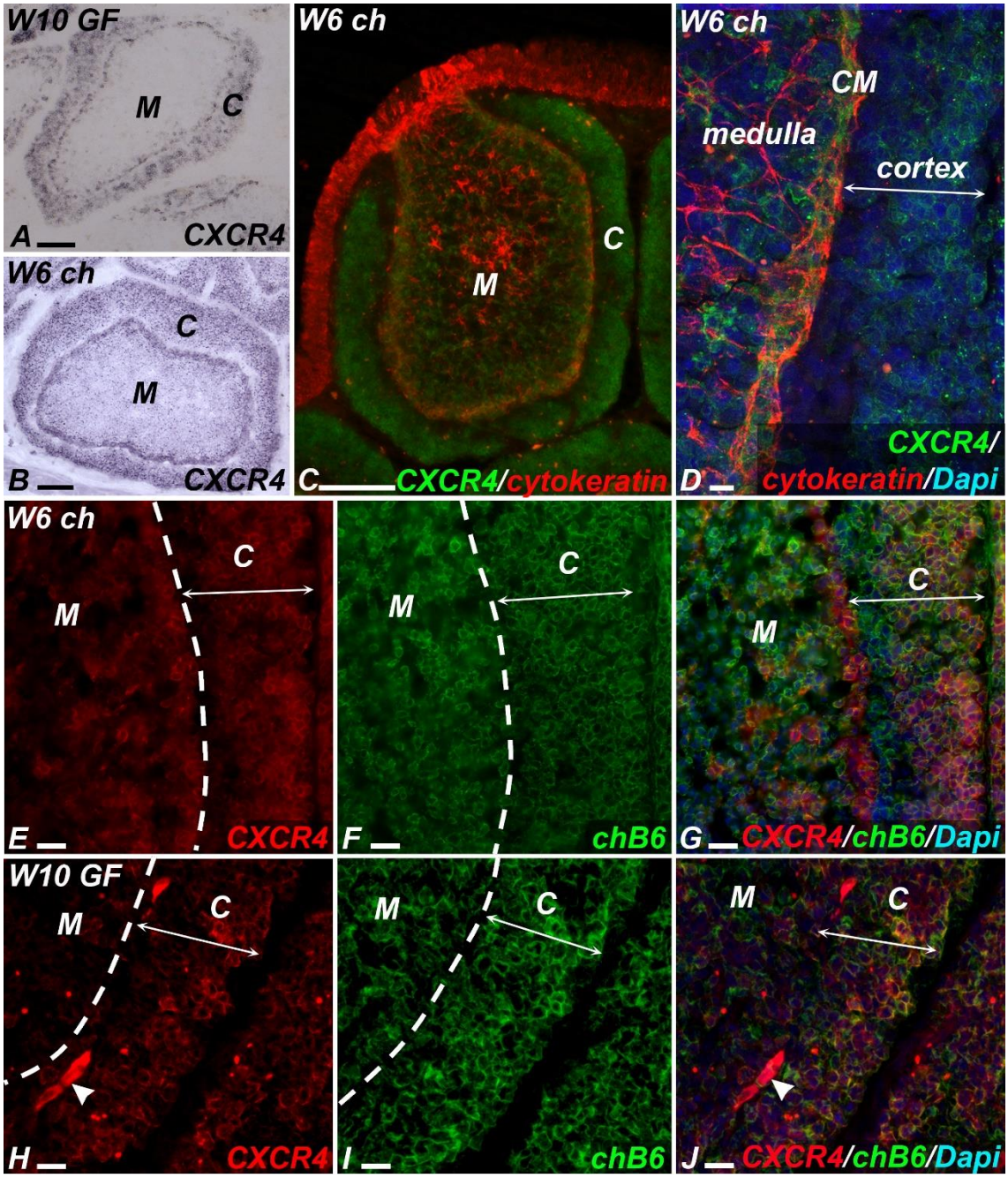
expressziójának a mértéke eltér a kéreg különböző területein (17. ábra D-G). A follikulusok kéregállományának külső szélén lokalizálódó B lymphocytákat erős CXCR4 pozitivitás jellemzi (CXCR4^{high}), míg közvetlenül a kéreg-velő határ melletti belső, keskeny sávban lévő chB6+ sejtek CXCR4 pozitivitása gyenge (CXCR4^{low}) vagy teljesen hiányzik (CXCR4-) (17. ábra D, E, G).

A csirkében megfigyelt fokozott és gyenge CXCR4 expressziót (CXCR4^{high} és CXCR4l^{ow}/CXCR4-) mutató B lymphocyta populációk szintén kimutathatóak gyöngytyúk bursai follikulusaiban (17. ábra H-J). A csirkével teljesen megegyező eloszlást mutatva, a gyöngytyúk chB6+/CXCR4^{low}/CXCR4- B lymphocytái a cortico-medulláris határ mentén helyezkednek el, ahol a kéregállomány kapilláris hálózata is húzódik. A kapillárisok endothel sejtjei ugyancsak expresszálják a CXCR4 receptort (17. ábra H, J) (Nagy et al., 2020).

A továbbiakban megvizsgáltuk a CXCR4 receptor kifejeződését a bursa Fabricii ontogenezise során, ezért különböző embrionális stádiumú gyöngytyúk és a csirke szöveti mintáin végeztünk összehasonlító immunhisztokémiai festéseket. A gyöngytyúk hosszabb embrionális fejlődése miatt (26 nap) a bursai follikulusok fejlettségi állapotát vettük figyelembe és hasonlítottuk össze a csirke megfelelő embrionális stádiumaival (18. ábra A-E).

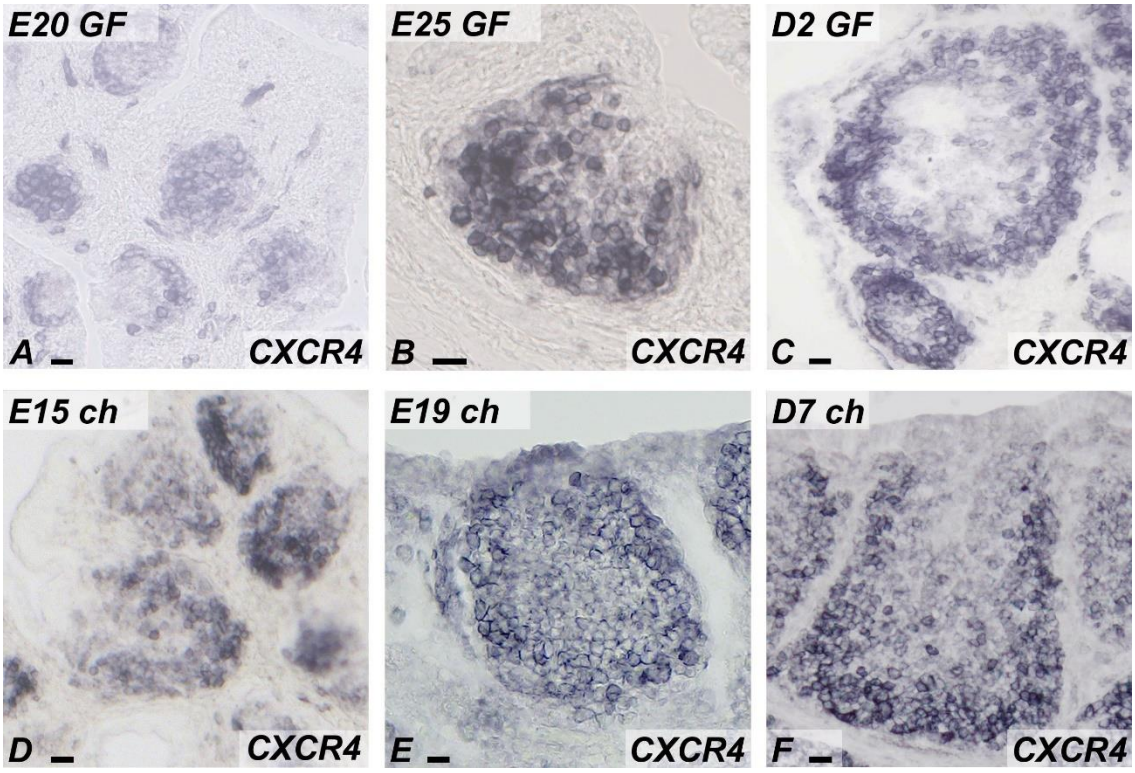
Gyöngytyúkban a 20. embrionális napon (E20) a fejlődő follikulus bimbókat kitöltő szinte valamennyi kerekded sejt festődik az anti-CXCR4 ellenanyaggal (18. ábra A), hasonlóan az E13-as stádiumú csirke embrió follikulusaihoz (18. ábra D). A kikelést megelőző napokban (gyöngytyúk E25, csirke E19), a folliulusok középső részén, a leendő medulláris területen elhelyezkedő B lymphocyták halványabb immunpozitivitást mutatnak az anti-CXCR4 ellenanyaggal (18. ábra B, E). Kikelést követően mind a gyöngytyúk, mind a csirke follikulusai esetén a CXCR4 receptor expressziója a medulla területén lecsökken, és az újonnan kialakult kéregállományra korlátozódik (18. ábra C, F).

Összefoglalás: Komparatív immunhisztokémiai eredményeink alapján elmondható, hogy míg embrionálisan valamennyi bursalis B lymphocytája CXCR4 pozitivitást mutat. A kikelést követően viszont a receptor a follikulusok kéregállományi B lymphocytáin marad fenn heterogén expressziós mintázatot (CXCR4^{high}/CXCR4^{low}) mutatva.



17. ábra: *A corticális B lymphocyták CXCR4 receptorának heterogén expressziós mintázata felnőtt gyöngytyúkban és csirkében.* **A)** 10 hetes gyöngytyúk (10W GF) és **B)** 6 hetes csirke (6Wch) bursai follikulusainak anti-CXCR4 ellenanyaggal történő, kloronaftolosan előhívott immunjelölése hasonló képet mutat. **C) és D)** Kettős immunjelölés 6 hetes csirke bursai follikulusain anti-cytokeratin (piros) és anti-CXCR4 (zöld) ellenanyagokkal. A medulla retikularis epitheliuma, valamint a cortico-medullaris határ (CM) cytokeratin pozitív (piros) területén kevés CXCR4+ (zöld) sejt látható. CXCR4 pozitivitás elsősorban a cortex külső régiójában detektálható. **E-G)** Kettős immunjelölés 6 hetes csirke bursai follikulusainak cortico-medulláris határ területéről (szaggatott vonal); cortex (C), medulla (M). **E)** Anti-CXCR4, **F)** chB6 ellenanyagok jelölésének detektálása és **G)** kolokalizációjuk DAPI (kék) magfestéssel. A cortex külső szegmensének chB6+ B lymphocytái (zöld) jelentős mértékben expresszálják a CXCR4

receptort (CXCR4^{high}) (piros), míg közvetlenül a cortico-medulláris határ mentén elhelyezkedő B lymphocyták a CXCR4-et alacsony intenzitást mutatva vagy egyáltalán nem expresszálják (CXCR4^{low}/CXCR4-). **H-J)** Kettős immunjelölés 10 hetes gyöngytyúk bursai follikulusainak cortico-medulláris határáról (szaggatott vonal); cortex (C), medulla (M). **H)** Anti-CXCR4 és **I)** chB6 (zöld) ellenanyagok jelölésének detektálása és **J)** kolokalizációjuk DAPI magfestéssel (kék). A chB6+/CXCR4^{low}/CXCR4- sejtek a cortico-medulláris határ mentén lokalizálódnak. **H, J)** CXCR4 pozitivitás az erek endothel sejtjein is kimutatható (nyílhegy). Bar: A-C: 100 µm; D-J: 10 µm.



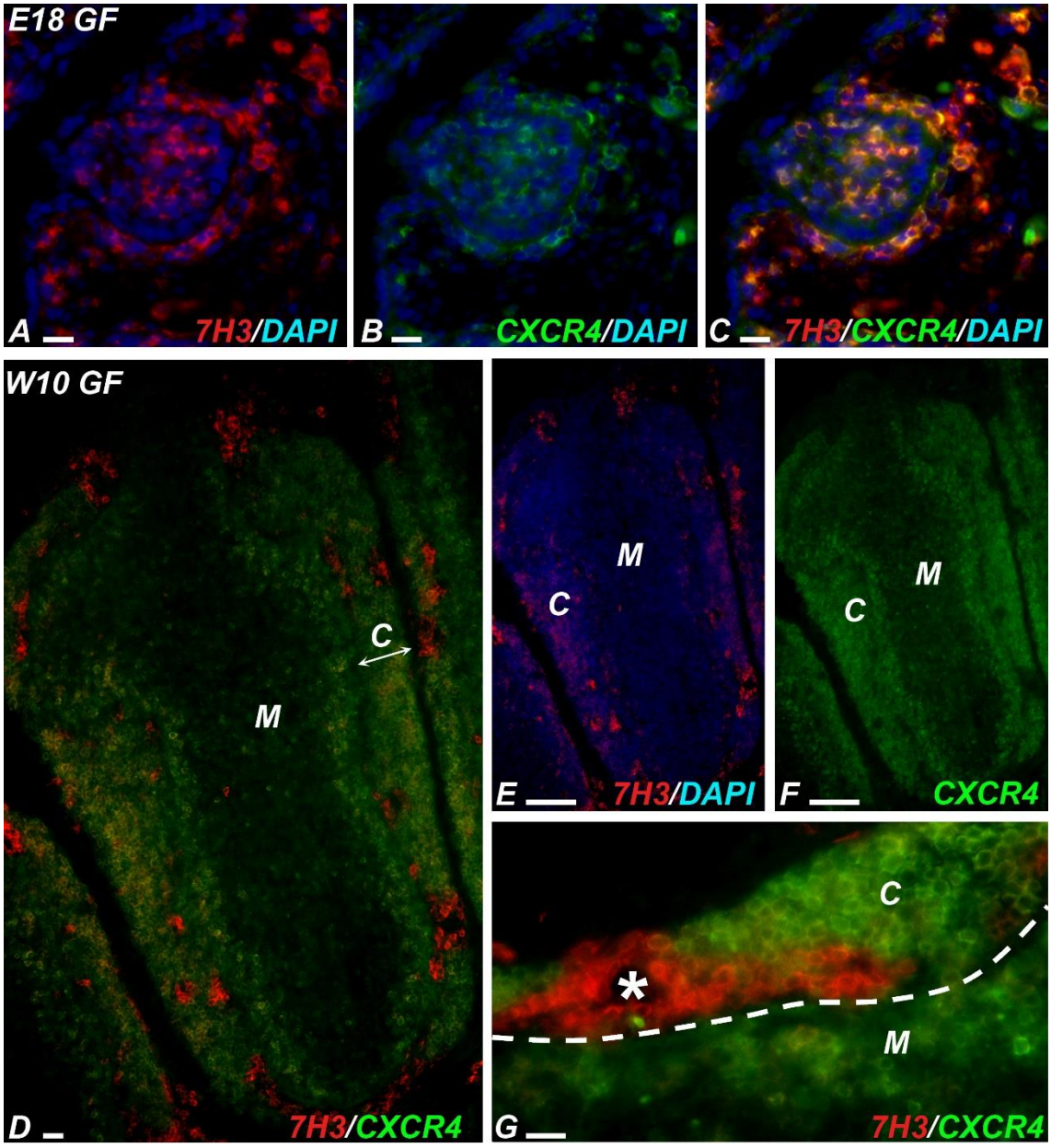
18. ábra: *B lymphocyták CXCR4 expressziós mintázatának változása a gyöngytyúk és csirke bursa Fabricii organogenezise során.* **A-E)** Kloronaftolosan előhívott egyszeres immunjelölés. **A-C)** Különböző korú gyöngytyúk (GF) bursa follikulusok CXCR4 receptort expresszáló sejtjei. **D-F)** Különböző korú csirke (ch) bursa follikulusok CXCR4 receptort expresszáló sejtjei. **A, D)** A follikulus bimbók kialakulása után a gyöngytyúk E20-as stádiuma, a csirke E15-ös stádiumának megfelelő fejlettségű, ahol a follikulus bimbókat kitöltő sejtek nagy része expresszálja a CXCR4 receptort. **B, E)** A kikelést megelőzően a gyöngytyúk (E25) és csirke (E19) follikulus bimbóinak közepén az anti-CXCR4 festés halványabb reakciót ad. **C, F)** Kikelés után a CXCR4 receptor expressziója a fejlődő kéregre korlátozódik. E: embrionális nap, D: kikelés utáni nap. Bar: A-F: 10 µm.

5.4.2. A gyöngytyúk bursalis B lymphocytáira jellemző CXCR4 receptor és 7H3 antigén expressziós mintázatának összehasonlítása

A gyöngytyúk bursalis B lymphocytáinak fejlődése során megfigyelt változó CXCR4 pozitivitást hasonlítottuk össze a 7H3 antigén időben szintén változó expressziós mintázatával. Kettős immunjelölést alkalmazva kimutattuk, hogy embrionálisan (E18 stádium) a bursai follikulusok B lymphocytái mind a 7H3 (19. ábra A), mind az anti-CXCR4 ellenanyaggal (19. ábra B) egyenletesen jelölődnek és a két marker kolokalizál (19. ábra C). A korábbi (5.2.2. és 5.4.1.) fejezetekben leírt módon a fejlődő folliculus bimbókat kitöltő bursai B lymphocyták a kikelésig egységesen expresszálják a 7H3 antigént és a CXCR4 receptort is.

A CXCR4 receptor és a 7H3 antigén expressziós mintázata a kikelés után mutat jelentős változást. A 10 hetes felnőtt gyöngytyúk bursai follikulusaiban a 7H3 antigén expressziója már lecseng a velőállomány területén, egyedül a kéreg-velő határ mentén, az erek körül lokalizálódó B lymphocytákon marad fenn (19. ábra D, E). Ugyanebben a stádiumban a CXCR4 receptor heterogén expressziós mintázatot mutat a kéregállományi B lymphocytákon (19. ábra F). Kettős immunfluoreszcens jelölést követő kolokalizációs vizsgálattal kimutattuk, hogy a 7H3 pozitivitás kifejezetten a kérgi CXCR4- vagy CXCR4^{low} sejteken detektálható (19. ábra D, G).

Összefoglalás: Ezen eredményeink alapján a felnőtt állatok bursa Fabricii-ben a 7H3 antigént az a kéregállományi, kapillárisok körül lokalizálódó B lymphocyta populáció expresszálja, amely a CXCR4 receptort alacsony mértékben vagy egyáltalán nem fejezi ki.



19. ábra: A *CXCR4 receptor és a 7H3 antigén expressziós mintázatának összehasonlítása gyöngytyúk bursa Fabricii-ben.* **A-C)** 18 napos gyöngytyúk embrió (E18 GF) bursai follikulusain végzett kettős immunfluoreszcens jelölés **A)** 7H3 ellenanyag és DAPI magfesték **B)** anti-CXCR4 ellenanyag és DAPI magfesték. **C)** A 7H3-CXCR4 kolokalizációt mutató sejtek sárgán jelölődnek. **D-G)** 10 hetes gyöngytyúk (10W GF) bursai follikulusain végzett kettős immunfluoreszcens jelölés. **D)** 7H3 és anti-CXCR4 ellenanyaggal történő jelöléskor a 7H3 antigén expressziója a kéregállomány (C) $CXCR^{low}$/CXCR4- B lymphocytáira jellemző. **E)** 7H3 ellenanyag és DAPI magfesték. **F)** Anti-CXCR4 ellenanyag detektálása. **G)** A 7H3+/$CXCR4^{low}$/CXCR4- sejtek a kéregállományi (C) erek (*) körül lokalizálódnak (M: medulla, szaggatott vonal: cortico-medullaris határ). Bar: A-C és G: 10 µm; D-F: 100 µm.

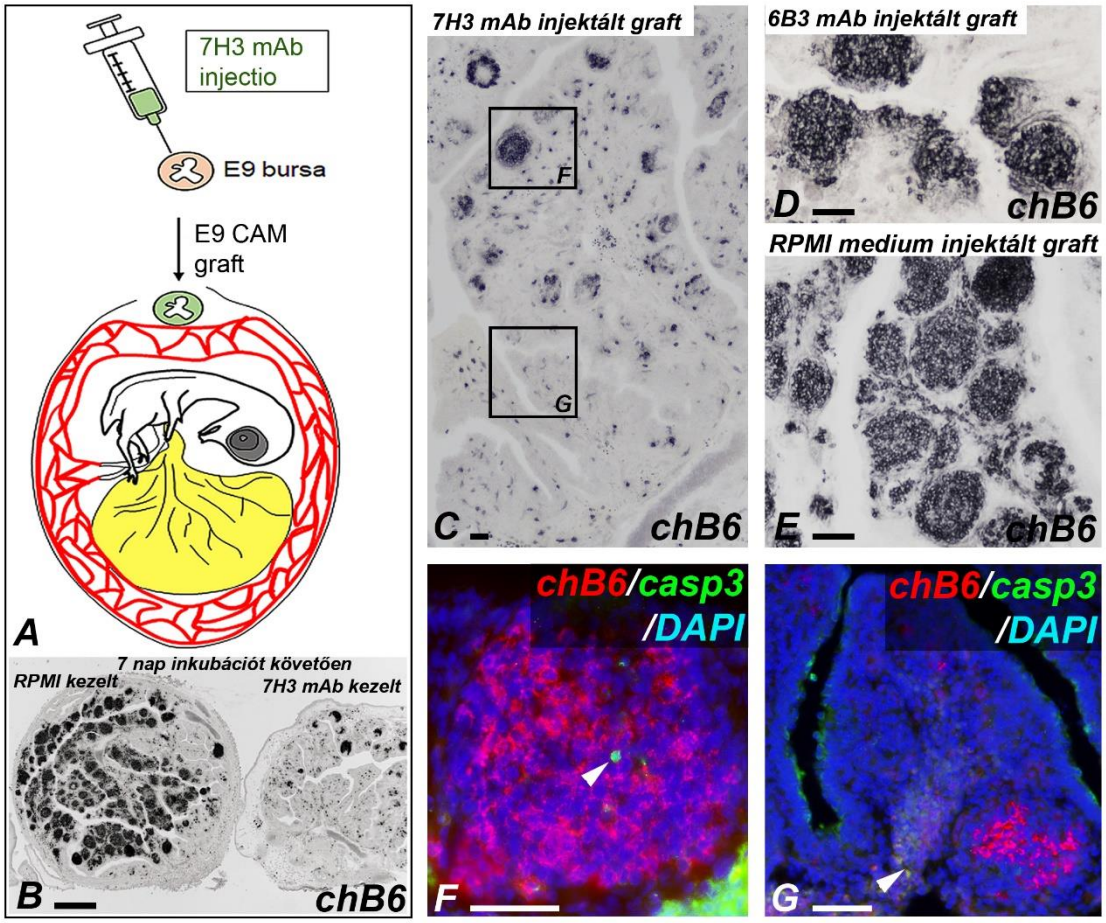
5.5. 7H3 antigén funkció blokkoló vizsgálata

5.5.1. 7H3 ellenanyag hatása a B lymphocyták bursa telepének kolonizációjára

Bizonyos ellenanyagok képesek funkció blokkoló molekulaként meggátolni vagy megzavarni a felismert antigénjük működését (Chung & Lillehoj, 1991; George-Weinstein et al., 1997; Plett et al., 2002; Zhao et al., 2011).

A 7H3 ellenanyag funkció blokkoló hatásának vizsgálatára 9 napos csirke embrió (E9) chorioallantois membránjára B lymphocyták által még nem kolonizált E9-es bursa telepet helyeztünk, amelynek a mesenchymájába az *in vivo* tenyésztés megkezdése előtt ismert koncentrációjú 7H3 ellenanyagot injektáltunk (n=8) (20. ábra A). Kontrollként komplett RPMI - 1640 tenyésztő médiumot (n=6), illetve a B lymphocyták által nem expresszált, neuron specifikus N-cadherin-t felismerő egér monoklonális ellenanyagot használtunk (klón 6B3) (n=7). Az anti-N-cadherin ellenanyagot a 7H3-hoz hasonló koncentrációban és térfogatban injektáltuk. A chorioallantois membránon történő tenyésztést követően a 7H3 ellenanyaggal kezelt csoport bursa follikulusainak rendellenes fejlődését figyeltük meg, amely esetben kevesebb számú, csökevényes follikulus bimbó alakult ki (20. ábra B, C). A kontroll csoportoknál, így az anti-N-cadherin ellenanyaggal (20. ábra D), illetve komplett RPMI-1640 médiummal (20. ábra B, E) történő kezelések után a follikulusok kialakulása nem szenvedett zavart. Mivel a chB6+ B lymphocyták száma jelentősen kevesebb volt a 7H3 ellenanyaggal injektált bursában, ezután megvizsgáltuk, hogy az ellenanyagnak van-e hatása a B lymphocyták túlélésére. Anti-caspase-3 ellenanyag használatával a B lymphocyták, valamint a mesenchymális sejtek között kis számban ugyan detektáltunk apoptózist (20. ábra F, G), de az apoptotizáló B lymphocyták aránya szemikvantitatív megítélés alapján nem különbözött a különböző kezelések után.

Összefoglalás: Eredményeink alapján a 7H3 ellenanyag bekötődve saját antigénjéhez funkció blokkoló hatást ért el, megzavarva a B lymphocyta prekurzorok follikulus bimbókba történő migrációját.



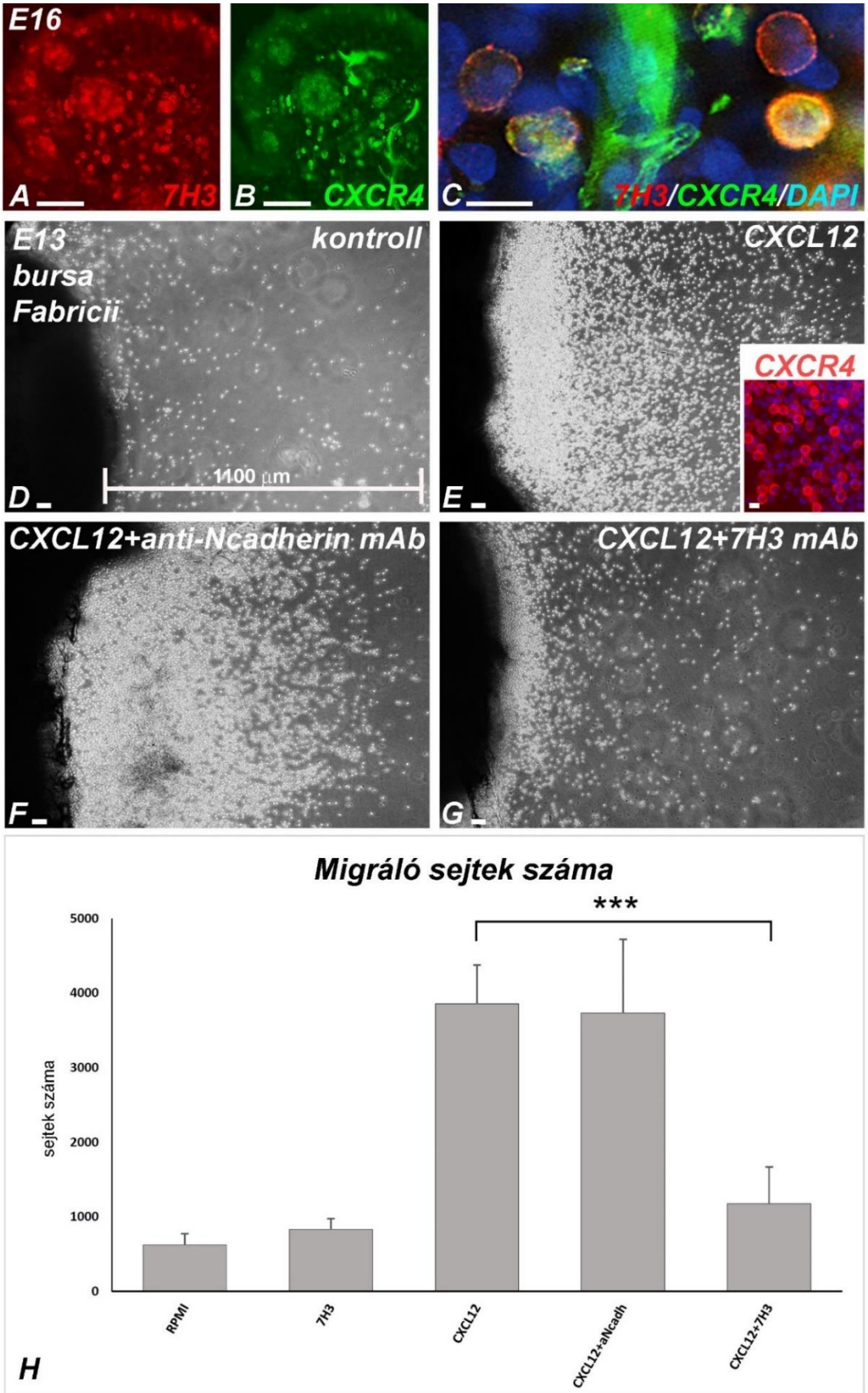
20. ábra: *Antigén-antitest kapcsolódásán alapuló funkció blokkoló vizsgálat.* **A)** *In vivo* vizsgálat sémás rajza: 9 napos csirkéből izolált bursa Fabricii mesenchymájába 7H3 ellenanyagot (mAb), anti-N-cadherin ellenanyagot (6B3 mAb) vagy komplett RPMI-1640 médiumot injektáltunk, majd E9-es stádiumú csirke embrió chorioallantois membránjára (CAM) transzplantáltuk, és további 7 napig inkubáltuk *(sémás ábra forrása: Fejszák et al., 2022; Figure 6. után módosítva).* **B-E)** Kloronaftollal előhívott, chB6 ellenanyaggal történő egyszeres immunjelölés. **B)** Az inkubációs idő eltelte utáni 7H3 ellenanyaggal kezelt és komplett RPMI-1640 médiumot kapott bursa Fabricii-k teljes keresztmetszeti képe chB6 immunfestést követően. **C)** 7H3 ellenanyaggal történő kezelés hatására csökkent a follikulus bimbók száma. A megjelenő follikulusok csökevényesek, kevés chB6+ B lymphocytát tartalmaznak. **D)** A kontroll csoportokként alkalmazott anti-N-cadherin ellenanyaggal vagy **E)** komplett RPMI médiummal injektált bursákban a follikulogenezis nem szenvedett zavart. **F) és G)** A „C" képen körülhatárolt területekről származó, nagyobb nagyítású képek: a 7H3 ellenanyaggal kezelt bursa kettős immunfluoreszcens jelölése chB6 (piros), anti-caspase-3 (zöld) ellenanyaggal és DAPI magfestéssel. Néhány, elszórtan lokalizálódó, apoptotizáló sejt detektálható mind **F)** a follikulusok, mind **G)** a bursa mesenchymájának területén. Bar: B: 1000 µm; C, D, E 100 µm; F, G: 50 µm.

5.5.2. *In vitro* sejtmigráció vizsgálata 7H3 ellenanyag és CXCL12 kemoattraktáns együttes alkalmazása mellett

A 7H3 antigén sejtmigrációban betöltött szerepét *in vitro* kísérletben is megvizsgáltuk. A kísérlet kiindulási alapkoncepcióját arra alapoztuk, hogy embrionális csirke bursa Fabricii fejlődő follikulus bimbóit kitöltő 7H3+ B lymphocyták (21. ábra A) a CXCR4 migrációs receptort is expresszálják (21. ábra B, C).

Az *in vitro* kísérlet során E13-as korú bursa redőket fibronektinnel bevont Petri csészébe helyeztünk ki, és 24 óráig komplett RPMI-1640 médiumban (n=5) inkubáltunk. Az inkubációs idő eltelte után kis mennyiségű kivándorolt sejtet detektálhattunk (21. ábra D, H). Hasonló eredményt kaptunk, amikor a tenyésztőmédiumhoz tisztított 7H3 ellenanyagot (n=5) adtunk (21. ábra H). A következő lépésben, hogy elősegítsük a bursa redőkből a B lymphocyták kivándorlását, a tenyészetekhez CXCL12 kemoattraktánst is adagoltunk. Sejtszámlálás alapján a CXCL12 molekula jelenlétében (n=6) a bursa redőkből kivándorló sejtek száma ötszörösére növekedett a komplett RPMI-1640 médiumban tenyésztett csoportéhoz képest (21. ábra E, H). A bursa redőkből kivándorló B lymphocyták expresszálták a CXCR4 receptort (21. ábra E inset). Ezt követően, a CXCL12 kemokin jelenléte mellett, tisztított 7H3 ellenanyagot is adtunk a tenyészetekhez (n=6). A 7H3 ellenanyag jelenléte szignifikánsan ($p \leq 0.001$) lecsökkentette a médiumba kivándorló B lymphocyták számát (21. ábra G, H). Negatív kontrollként ebben az esetben is anti-N-cadherin ellenanyagot alkalmaztunk CXCL12 jelenlétében (n=6). Az anti-N-cadherin ellenanyag hozzáadása nem befolyásolta a CXCL12 hatására kivándorló sejtek számát. (21. ábra F, H).

Összefoglalás: In vitro kísérletünk alapján megállapítható, hogy az embrionális bursa redőkből CXCL12 kemoattraktáns hatására a B lymphocyták intenzíven kivándorolnak a fibronektinnel bevont felszínre. A 7H3 ellenanyag és CXCL12 kemoattraktáns együttes alkalmazása esetén a kilépő CXCR4+ B lymphocyták száma jelentősen lecsökkent.

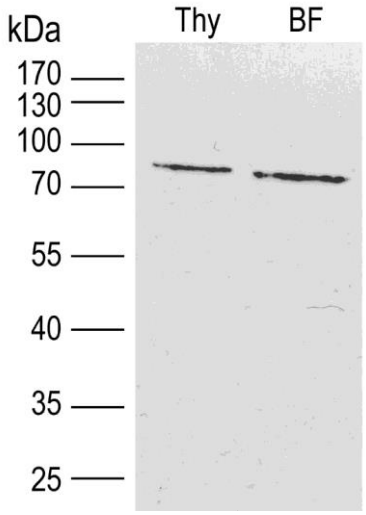


21. ábra: *In vitro funkció blokkoló vizsgálat: embrionális bursa redők tenyésztése CXCL12 kemoattraktáns és 7H3 ellenanyag jelenléte mellett* **A-C)** 16 napos csirke embrió (E16) bursa

follikulusainak kettős immunfluoreszcens jelölése. **A)** 7H3 és **B)** anti-CXCR4 ellenanyaggal történő jelölés esetén **C)** a 7H3+ B lymphocyták expresszálják a CXCR4 migrációs receptort. **D-H)** 13 napos csirke embrió (E13) bursa Fabricii redőinek *in vitro* tenyésztése. **D)** A komplett RPMI-1640 médiumban inkubált bursa redőket kevés számú sejt hagyta el. **E)** A CXCL12 kemoattraktánst is tartalmazó médiumban jelentős mennyiségű CXCR4+ sejt vándorolt ki (inset: CXCR4 immunpozitivitás piros színnel látható). **F)** A CXCL12 mellett alkalmazott anti-N-cadherin ellenanyag (mAb) nem befolyásolta a kivándorló sejteket, ellentétben **G)** a 7H3 ellenanyag (mAb) és CXCL12 együttes alkalmazásával, amikor is a kivándorló sejtek száma jelentősen csökkent. **H)** A különböző kísérleti és kontroll csoportok esetén megfigyelt bursa redőkből kivándorló sejtek számának ábrázolása. Statisztikai elemzés Kruskal-Wallis teszt alkalmazásával, majd post-hoc Dunn teszttel történt. Szignifikancia: ***$P<0.001$. Bar: A, B és D-G: 50 µm; C és E inset: 5 µm.

5.6. A 7H3 ellenanyag által jelölt antigén molekulatömegének meghatározása

A 7H3 antigén molekulatömegét 6 hetes gyöngytyúk bursa Fabricii és thymus lizátumból határoztuk meg gélelektroforézissel és Western blottal. A gyöngytyúkból eltávolított és megtisztított bursa redőkből, illetve thymus lebenyekből lymphocyta sejtszuszpenziót készítettünk. Centrifugálást követően a kiülepedett sejteket lízis pufferrel kezeltük. A kapott fehérje lizátumokat lecentrifugáltuk és a felülúszókat használtuk fel a gélelektroforézishez, valamint a blottoláshoz. Eredményeink azt mutatják, hogy reduktív körülmények között a 7H3 ellenanyag egyetlen, ~80 kDa tömegű molekulákat ismer fel a thymus és bursa Fabricii lizátumaiban egyaránt (22. ábra).



22. ábra: *7H3 ellenanyag által jelölt antigén molekula tömegének meghatározása Western blottal*. 6 hetes gyöngytyúk thymus (Thy) és bursa Fabriciiből (BF) származó mintái. A 7H3 monoklonális ellenanyag ~80 kDa molekula tömegű antigént ismer el, mindkét típusú lizátumban.

6. MEGBESZÉLÉS

A fejlődésbiológiai és immunológiai kutatásokban a madarak primer nyirokszervei, a bursa Fabricii és a thymus kiváló lehetőséget nyújtanak a lymphocyták egyedülálló, más vérsejt alakoktól független fejlődésének, differenciálódásának és érésének tanulmányozására (Glick, 1994; Nagy et al., 2022).

Az elmúlt három évtizedben számos vizsgálati eredmény bizonyítja, hogy a bursa Fabricii különböző B lymphocyta populációk számára nyújt támogató szöveti környezetet. Toivanen és Toivanen csirkén végzett klasszikus immunológiai és sejttranszplantációs kísérletei igazolták, hogy a kikelést követően a B lymphocyták eltérő fejlődési stádiumokban fordulnak elő a bursai follikulusokban. Ezek a B lymphocyta populációk funkciójukat tekintve eltérő módon képesek a B sejt depletált állatok bursa Fabricii-ének rekonstrukciójára (Toivanen et al., 1972; Toivanen & Toivanen, 1973).

A ’90-es évektől kezdve több olyan monoklonális ellenanyag készült, amely alkalmas a madarak B lymphocytáinak szelektív jelölésére. Ezek között vannak olyan ellenanyagok, amelyek kifejezetten a bursa Fabricii kéregállományi B lymphocytáit (Paramithiotis & Ratcliffe, 1994b; Sayegh et al., 2000) vagy csak a medullaris B lymphocytákat (Masteller et al., 1995b; Withers et al., 2006) jelölik. A lymphocytákat jelölő ellenanyagok nagy segítséget nyújtanak a bursa Fabricii-ben zajló fejlődésbiológiai mechanizmusok és immunológiai folyamatok megértéséhez. Továbbá, számos olyan monoklonális ellenanyag is elérhető a kereskedelemben, amely nemcsak a csirke lymphoid sejtjeire specifikus, hanem a fürj, gyöngytyúk vagy a pulyka lymphocytáit is jelölik. Ezekkel a markerekkel a vadon élő madarak immunrendszere is tanulmányozható és az eredmények összehasonlíthatóak a belterjesen tenyésztett csirke törzseken végzett immunológiai vizsgálatokból kapott eredményekkel. Annak ellenére, hogy funkcionális kísérletekkel igazolták, az egyes B lymphocyta populációk dinamikus változását a bursa fejlődése során, keveset tudunk sejtfelszíni expressziós mintázatukról, amely jellemezheti az eltérő fejlődési potenciállal rendelkező sejteket.

6.1. A 7H3 monoklonális ellenanyag egy B lymphocyta alpopulációt jelöl.

Doktori munkám első célkitűzése a 7H3 elnevezésű, IgG_{2b} izotípusú, gyöngytyúk és csirke specifikus egér monoklonális ellenanyag immuncitokémiai és biokémiai karakterizálása volt. Felnőtt gyöngytyúk bursa Fabricii follikulusainak

kéregállományában azt tapasztaltuk, hogy a 7H3 ellenanyag elszórtan megjelenő sejtcsoportokat jelöl, valamint intenzív immunreakciót ad a thymus kéreg- és velőállományban és a perifériás nyirokszervek T dependens területein is. Kettős immunhisztokémiai festésekkel kimutattuk, hogy a 7H3 ellenanyag a felnőtt gyöngytyúk T lymphocytái mellett szelektíven jelöli a bursa Fabricii follikulusainak egy B lymphocyta alpopulációját, amelyek a kéregállomány kapillárisai körül, csoportokat alkotva fordulnak elő. Összehasonlítva a madarak lymphoid sejtjeire vonatkozó szakirodalmi adatokat, a 7H3 ellenanyag festési mintázata jelentősen eltér a madarak B lymphocytáit jelölő egyéb ellenanyagokétól.

A 7H3 ellenanyag festési mintázatához hasonló módon, a CB11 és Hy86b5 ellenanyagok a T lymphocyták mellett, a bursai follikulusok kéregállományának egy-egy B lymphocyta alpopulációját jelölik (Olson & Ewert, 1990). Mind a CB11, mind a Hy86b5 ellenanyag által jelölt antigén különlegessége, hogy a fejlődés során expressziójuk lecsengést mutat. Csirkében, az embrionális fejlődés 12. napjától kezdve mindkét ellenanyag a fejlődő bursai follikulusokat kitöltő valamennyi B lymphocytát jelöli, de még a kikelés előtt az általuk felismert antigének kifejeződése drasztikus csökken, leszűkülve a kéregállomány egy alpopulációjára (Olson & Ewert, 1990). Embrionális és fiatal, kikelt gyöngytyúkokon végzett vizsgálataink során, a 7H3 antigén esetében is megfigyeltünk expressziós lecsengést a bursai B lymphocytákon, viszont ellentétben a CB11 és Hy86b5 antigénekkel, ez a kikelést követően történik. Embrionálisan, a bursai follikulus bimbókat kitöltő valamennyi B lymphocyta kifejezi a 7H3 antigént. Kikelés körül a 7H3 ellenanyag a legtöbb follikuláris B lymphocytát jelöli, majd a kikelést követő 2. héttől a medulláris sejteken csökken az expressziós szintje, fokozatosan leszűkülve a kéregállomány B lymphocytáira. A 10. héttől kezdve csak a kapillárisok körüli, izolált sejtcsoportokon ad immunreakciót, és az elkövetkező hetekben ez a festési mintázat változatlan marad (az állatokat 16 hetes korig vizsgáltuk). A 7H3 ellenanyag a CB11-től és Hy86b5-től nemcsak az expressziójának időbeli változásában, hanem az antigének molekula tömegében is eltérést mutatott. Western blot analízis során megállapítottuk, hogy a 7H3 ellenanyag reduktív körülmények között egy ~80 kDa tömegű molekulát ismer fel, míg a CB11 egy 37 kDa-os antigént, a Hy86b5 pedig egy 142 kDa-os és 162 kDa-os molekulákból álló heterodimert jelöl. Megjegyzendő, hogy a

CB11 és a Hy86b5 antigéneket jelölő ellenanyagok kereskedelemben nem elérhetők. Az eredeti közlemények megjelenése óta más kísérletben nem használták.

Az LT2 antigént szintén a bursai follikulusok corticalis sejtjei által expresszált molekulaként azonosították (Paramithiotis & Ratcliffe, 1994a; Sayegh et al., 2000). Az LT2 antigént, hasonlóan a 7H3 antigénhez, embrionálisan valamennyi bursalis B lymphocyta kifejezi, majd a kikelést követőn, az 1-3 hetes állatok follikulusainak kéregállományi B lymphocytái expresszálják. Az LT2 antigén perifériás keringésben lévő sejteken mutatott expressziós mintázata nem egyezik a 7H3 ellenanyaggal kapott eredményeinkkel, miszerint a kikelés után a vérben lévő B lymphocyták mintegy 60%-a erősen expresszálja az LT2 antigént (Paramithiotis & Ratcliffe, 1994a; Paramithiotis és Ratcliffe, 1994b). Munkánk során idősebb (10 hetes) gyöngytyúk bursai follikulusainak kéregállományában megvizsgáltuk az LT2+ sejteket, amelyek nem alkottak a 7H3 ellenanyag festésére jellemző sejtcsoportokat, hanem a csirkében publikált adatokhoz hasonló módon, elszórtan a kéreg teljes területén lokalizálódnak.

Emlősökben a celluláris immunválasz kialakításában szerepet játszó CD80/CD86 kostimulációs molekulákat az antigén prezentáló sejtek mellett (Damoiseaux et al., 1998) aktivált B lymphocyták is expresszálják (Sahoo et al., 2002; O'Neill et al., 2007). Lee és munkatársai létrehoztak egy egér monoklonális ellenanyagot, amely a csirke CD80-as (chCD80) molekuláját ismeri fel (Lee et al., 2011). Az anti-chCD80 ellenanyaggal a lép fehér pulpájában és a bélben dendritikus sejteket, illetve a lép vörös pulpájában monocytákat azonosítottak. Továbbá pozitív immunreakciót kaptak a bursa follikulusainak kéregállományában, ahol a chCD80+ sejteket monocytaként jellemezték. Habár a 7H3 és az anti-chCD80 ellenanyag bursai follikulusokban mutatott festési mintázata, a szakirodalmi adatok alapján hasonló, a 7H3 nem jelöli a myeloid sejtvonalhoz tartozó dendritikus sejteket és a monocytákat sem.

Egy másik, nemrég leközölt ellenanyag, amely szintén a bursa kéregállományi sejtjeinek egy csoportját jelöli, a csirke specifikus tumor nekrózis faktor-szerű ligand 1A (chicken tumor necrosis factor-like ligand 1A; chTL1A, molekulasúlya: 32 kDa) molekulát ismeri fel (Lee et al., 2014). Emlősökben a TL1A protein leukocytákra és antigén prezentáló sejtekre jellemző, amely kiemelten a T lymphocyták kostimulátoraként működve befolyásolja a gyulladásos citokinek termelését és a sejt proliferációt (Xu et al., 2022). A TL1A molekulának membránhoz kötött és aktívan

szekretált, szolubilis formája is ismert (Kim & Zhang, 2005; Pedersen et al., 2015). Lee és munkatársai által létrehozott csirke specifikus ellenanyaggal a csirke TL1A proteint szekretáló, kerekded morfológiájú sejteket sikerült azonosítani a bursa follikulusainak kéregállományában, valamint poligonális morfológiát mutató sejteket a thymusban és a coecalis tonsillában (Lee et al., 2014). Mivel 7H3 ellenanyaggal történő immun-hisztokémiai festéseink során minden esetben a lymphocyták sejtmembránját kirajzoló immunreakciót detektáltunk, így elmondható, hogy a csirke TL1A protein szekretált formájával ellentétben a 7H3 antigén egy sejtfelszíni, membránhoz kötött molekula.

A bursai B lymphocytákat szelektíven jelölő ellenanyagok közül, szakirodalmi adatok alapján, a 11A9 elnevezésű monoklonális ellenanyag mutatta a legnagyobb egyezést a 7H3 ellenanyag festési mintázatával. A 7H3 antigénhez hasonlóan, a 11A9 monoklonális ellenanyag által jelölt, úgynevezett Ov antigén (más néven chL12) is korai embrionális megjelenést mutat (Houssaint et al., 1991). A legelső Ov+ sejteket 3 napos csirke embrió szikhólyagjának vérszigeteiben azonosították, majd idősebb embriókban ugyanúgy, mint a 7H3 antigént, a CD45+ sejtek is expresszálják az Ov antigént. A 7H3 jelöléssel azonos módon, 14 napos csirke embrió bursájának valamennyi chB6+ B lymphocytája, valamint a thymust kolonizáló T lymphocyta prekurzorok is jelölődnek a 11A9 ellenanyaggal. A kikelést követően viszont a bursai B lymphocytáknak csak 4%-a ad immunreakciót. Későbbi publikációkban megállapították, hogy a bursai B lymphocyták közvetlenül a perifériára való emigrálásuk előtt kezdik el kifejezni az Ov antigént, mivel a perifériás B lymphocyták, a T lymphocytákkal azonos módon szintén Ov immunpozitívak (Paramithiotis & Ratcliffe, 1993). Ezzel ellentétben, immunhisztokémiai vizsgálataink alapján a 7H3 ellenanyag a gyöngytyúk perifériás B lymphocytáit nem jelöli, valamint a 7H3 antigén molekula tömege is különbözik a 35 kDa-os Ov antigén molekula súlyától (Härtle et al., 2022). Az Ov antigént szelektíven felismerő ellenanyagot termelő hybridoma kereskedelemben nem kapható.

Összefoglalva a kereskedelemben elérhető B lymphocyta markerek és a korábbi publikációkban leírt ellenanyagok festési mintázatának komparatív elemzését, megállapítható, hogy a 7H3 monoklonális ellenanyag egy új marker, amely specifikusan a bursai B lymphocyták egy alpopulációjára jellemző, ~80 kDa tömegű molekulát ismer fel.

6.2. A 7H3 ellenanyag jelöli a korai vérképző őssejteket.

A 7H3 ellenanyag a felnőtt állatok lymphocytái mellett, már a korai vérképzés során megjelenő hematopoietikus sejteket is jelöli. Immunhisztokémiai festések alkalmazásával az első 7H3+ sejteket 2 napos gyöngytyúk embrió (HH12) szikhólyagjának vérszigeteiben azonosítottuk. Későbbi fejlődési stádiumokban már számos kerekded morfológiával rendelkező 7H3+ sejtet figyeltünk meg az extraembrionális erek lumenében, illetve szorosan az endothel sejtekhez kapcsolódva. Ezek a korai, 7H3+ sejtek a hematopoietikus sejtekre specifikus QH1 monoklonális ellenanyag által jelölt α-macroglobulint is koexpresszálták. A QH1 elnevezésű ellenanyag a fürj embriók hematopoietikus és endothel sejtjeit jelölő marker (Pardanaud et al., 1987), amely saját adataink szerint keresztreagál a gyöngytyúk sejtjeivel is. A QH1 ellenanyag csirkével nem mutat keresztreakciót, ezért helyette a CD45 molekulát felismerő ellenanyagot használtuk a hematopoietikus sejtek azonosítására (Jaffredo et al., 1998, Dóra et al., 2017).

A fejlődés kezdeti szakaszában (HH3-HH5) a szikhólyag vérszigeteiben primitív hematopoietikus sejtek keletkeznek (Minko et al., 2003; Sheng, 2010), amelyek erythro-myeloid sejtvonal irányú elköteleződést mutatva korai erythrocyták, primitív makrofágok, mikroglia sejtek, valamint a BSDC prekurzorok létrehozásában vesznek részt (Cuadros et al., 1992; Nagai & Sheng, 2008; Sheng, 2010; Pardanaud & Eichmann, 2011; Dóra et al., 2017). A 7H3 ellenanyag extraembrionálisan kizárólag kerekded morfológiájú sejteket jelölt, és nem mutatott immunreakciót sem a csirkében leírt, szikhólyagi CD45+ amőboid vagy erősen nyúlványos myeloid prekurzor sejtekkel (Dóra et al., 2017), sem az ovális alakú, sejtmaggal rendelkező erythrocytákkal vagy a QH1+ endothel sejtekkel.

A 7H3 antigén hematopoietikus sejtekre jellemző expresszióját későbbi stádiumokban (HH19-HH25) az intraembrionális vérképző helyeken is megfigyeltük. Gerinces embriókban a definitív vérképző őssejteket létrehozó IAHC sejtjei között, valamint a para-aortikus régióban számos 7H3+ sejtet azonosítottunk, amelyek szintén a vérképző őssejtekre jellemző QH1 antigént expresszálták. A legtöbb gerinces faj esetén a dorsalis aorta ventrális falában megjelenő IAHC az egyik legjobban karakterizált intraembrionális vérképző hely (Medvinsky & Dzierzak, 1996; Jaffredo et al., 1998; Ciau-Uitz et al., 2000; Oberlin et al., 2002; Bertrand et al., 2010; Zhao et al., 2022). Az

IAHC-ből leváló, definitív hematopoietikus őssejtek hozzák létre a későbbi para-aortikus régiót, ahol génexpressziós vizsgálatok alapján megjelennek a lymphoid sejtvonal irányban elköteleződő első prekurzor sejtek (Lassila et al., 1979; Reynaud et al., 1992; Lampisuo et al., 1998; Dunon et al., 1999; Dóra et al., 2017). Mivel a 7H3 antigén az intraembrionális vérképző helyek QH1+ hematopoietikus sejtjein már jelen van és a későbbiekben differenciálódó lymphocyták is expresszálják, ezért a 7H3 ellenanyag alkalmas marker lehet a lymphoblastok fejlődésének nyomon követésére. Az extra-, és intraembrionális vérképző helyeken megfigyelt 7H3+/QH1+ sejtek pontos differenciáltsági fokának meghatározása érdekében további terveink között szerepelnek génexpressziót célzó vizsgálatok, ahol a GATA3, Lmo2, Scl és Runx1 gének *in situ* hibridizációs kimutatását végezzük a 7H3 ellenanyag jelölése mellett.

Mivel a korai embrióban az extra-, és intraembrionális vérképző helyeken egyaránt számos 7H3+ sejt azonosítható, felmerült a kérdés, vajon a szikhólyagban található 7H3+ sejtek intraembrionális területről származnak vagy *in loco* differenciálódnak. Egy általunk kifejlesztett mikrosebészeti technika, a teljes embrió ablációját követő *in ovo* szikhólyag tenyésztésével bizonyítottuk, hogy a HH12-es stádiumban megfigyelhető, 7H3+/QH1+ sejtek *in loco* extraembrionálisan keletkeznek és nem a keringésen keresztül jutnak a szikhólyag területére. Az extraembrionális 7H3+/QH1+ sejtek egy része egyesével vagy csoportosával a fejlődő erek endotheliumához kapcsoltan lokalizálódott, és ez a megjelenési forma megegyezik a HH7-HH10 embrionális stádiumokban zajló szikhólyagi vérképzés formájával (Downs, 2003). Extraembrionálisan megjelenő lymphoid progenitor sejteket már a ’90-es években, *in vitro* szikhólyagi sejttenyészeteken végzett sejtdifferenciációs vizsgálatokkal is kimutattak (Liu & Auerbach, 1991; Huang et al., 1994; Godin et al., 1995). Legfrissebb sejt-sorskövetéses és génexpressziós vizsgálatok megerősítik, hogy a lymphoid sejtvonalat létrehozó definitív hematopoietikus őssejtek már a korai extraembrionális vérképzés során is kialakulnak (Seco et al., 2020; Zhao et al., 2022). Csirke embrióban megfigyelték, hogy az IAHC létrehozásáért is felelős hemogenikus endothel sejtek már a HH7-8 stádiumú szikhólyag falában is kimutathatóak, ahol definitív vérképző őssejteket tartalmazó vérszigetek megformálására képesek (Seco et al., 2020). Ezen legfrissebb irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy a 7H3 ellenanyag az extraembrionálisan megjelenő definitív hematopoietikus őssejteket is jelöli. Feltételezésünk megerősítésére

terveink között szerepel, hogy áramlási citometria segítségével izoláljuk az extraembrionálisan megjelenő 7H3+/QH1+ sejteket, amelyeket intravascularisan injektálunk a 7H3 ellenanyaggal keresztreakciót nem mutató fürj fogadó embrióba, hogy képesek-e a fejlődő lympho-myeloid szervek (bursa Fabricius, lép, csontvelő) telepének kolonizációjára.

A korai vérképző helyek után a 7H3 ellenanyaggal immunreakciót adó, legtöbb sejtet a fejlődő bursa Fabricii mesenchymalis telepében azonosítottunk. Madarakban a B lymphocyták fejlődése három diszkrét fázisra tagolható: prebursalis, bursalis és postbursalis stádiumokra (Toivanen et al., 1972; Toivanen & Toivanen, 1973; Toivanen et al., 1974; Ko et al., 2018). Napjainkig a legjobban feltárt és tanulmányozott sejtcsoport a prebursalis B lymphocyták populációja. A prebursalis B lymphocyták, azok a B sejt prekurzorok, amelyek a nyirokszerveken kívül hematopoietikus őssejtekből differenciálódnak és immunglobulin génjeik átrendeződését követően IgM-t illetve a chB6 anti-apoptotikus molekulát expresszáló sejtekként kolonizálják a bursa telepét (Houssaint et al., 1989; Houssaint et al., 1991; Sayegh et al., 1999). Gyöngytyúk embrió bursa Fabricii-ében a follikulus bimbókat még nem tartalmazó epithelio-mesenchymális redők megjelenése, a csirkében leírtakhoz képest (10E) néhány nappal később, a 13-14. embrionális napon figyelhető meg (Nagy et al., 2001). Ebben az időpontban a mesenchymát kolonizáló chB6+ prebursalis B lymphocyták a 7H3 antigént is expresszálják, valamint néhány 7H3+ sejt eléri és kolonizálja a felszíni epitheliumot. Két nappal később (E16), a megjelenő follikulus bimbókat 7H3+/chB6+ sejtek töltik ki és ez az állapot változatlan marad egészen a kikelés időpontjáig (Fejszák et al., 2022).

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

6.3. 7H3 antigén a B lymphocyták migrációját szabályozó molekula.

A prebursalis stádiumot leszámítva kevés információ áll rendelkezésre a kikelést követő, érett bursai mikrokörnyezetben történő B lymphocyta érési folyamatokról, valamint a bursa involúcióját követő postbursalis B lymphocyta populációkról. A szakirodalom egyik legvitatottabb kérdése a kikelést követően kialakuló bursai follikulusok kéregállományának funkciója. Ratcliffe és munkatársai szerint, a bursa follikulusainak kéregállományát a velőállományból kivándorló sejtek hozzák létre (Ratcliffe et al., 1987). Feltételezik, hogy a kéregállományi B lymphocyták, intenzív proliferációval felszaporodnak és fokozatosan a perifériára vándorolnak (Paramithiotis és Ratcliffe, 1994a). Fluoreszcens sejtjelöléses technikával kimutatták, hogy a bursalis B lymphocyták mintegy 5%-a vándorol ki naponta (Paramithiotis & Ratcliffe, 1993) és kifejezetten a follikulusok kéregállományának kapilláris hálózatán keresztül jut a perifériás keringésbe (Paramithiotis és Ratcliffe, 1994a).

Eredményeink alapján a 7H3 antigént expresszáló bursalis B lymphocyták csoportos megjelenése a follikulusok kéregállományi kapillárisai körül, egybeesik azzal a fejlődési időszakkal, amikor a B lymphocyták a bursa Fabricii-ból kivándorolnak, majd kolonizálják a perifériás nyirokszöveteket. Kísérletes munkám következő részében a 7H3 ellenanyag által felismert antigén funkciójának tanulmányozását tűztem ki célul. Vizsgálatainkat elősegítette a müncheni Ludwig-Maximilians Universität Állatorvosi Karának, Komparatív Immunológiai kutatócsoportjával közös kollaborációs kísérletsorozat, amelyben a CXCR4 migrációs receptor és ligandja, a kemokin hatású CXCL12 bursa Fabricii-ben való kifejeződését és a bursalis B lymphocyták migrációjában betöltött szerepét tanulmányoztuk (Nagy et al., 2020). Habár emlősökben számos irodalmi adat igazolja, hogy a CXCR4/CXCL12 jelátvitel befolyásolja a B lymphocyta progenitorok csontvelőn belüli migrációját (Nagasawa et al., 1996; Ma Q et al., 1999; Nie et al., 2004; Beck et al., 2014), a madarak B lymphocytáinak CXCR4 expresszióját korábban kizárólag PCR alapú RNS szekvencia vizsgálatokkal igazolták (Ko et al., 2018). Különböző embrionális korú, csirke bursa Fabricii-ken végzett immunhisztokémiai festésekkel kimutattuk, hogy valamennyi bursalis B lymphocyta kifejezi a CXCR4 receptort. Kikelés környékén a CXCR4 receptor csökkenő expressziós szintet mutat, majd a felnőtt állatok follikulusainak kéregállományi B lymphocytái heterogén módon fejezik ki azt. A follikulusok kéregállományának külső, szélesebb

szegmense a CXCR4 receptort magasan expresszáló (CXCR4^{high}) területnek bizonyult, míg közvetlenül a kéreg-velő határ közelében, a kérgi kapillárisok mentén egy alacsony expressziós intenzitást mutató (CXCR4^{low}/CXC4-) terület jelenik meg. Párhuzamos immunhisztokémiai festésekkel igazoltuk, hogy a CXCR4 migrációs receptor bursai B lymphocytákon mutatott expressziós mintázatának dinamikus változása a csirkével azonos módon zajlik a gyöngytyúk esetében is. Kettős immunhisztokémiai festésekkel bizonyítottuk, hogy a 7H3+ B lymphocyták a bursai follikulusok kéregállományának azon részében lokalizálódnak, ahol a sejteken a CXCR4 receptor alacsony expressziós szintje (CXCR4^{low}/CXCR4-) figyelhető meg.

Csirkén végzett áramlási citometriás mérések alapján laboratóriumunk kollaborációban kimutatta, hogy bursa Fabricii-ból kivándorolt, perifériás vérben jelen lévő B lymphocyta populáció gyenge CXCR4 pozitivitást mutat (Nagy et al., 2020). Így igazoltuk, hogy madarakban a CXCR4 receptor expressziójának csökkenése szükséges a naiv B lymphocyták bursa Fabricii-ból perifériára történő vándorlásához (Nagy et al., 2020). Eredményeinket alátámasztják a korábbi években emlősökben leírt folyamatok, miszerint a csontvelőben képződő, éretlen B lymphocyták perifériára történő kilépéséhez szükséges a CXCR4 receptor expressziójának csökkenése (Beck et al., 2014; Mcheik et al., 2019).

Mivel gyöngytyúk bursában a 7H3+ B lymphocyták a kéregállományi CXCR4^{low}/CXCR4- sejtpopulációhoz tartoznak, azt feltételeztük, hogy a 7H3 antigén egy sejtmigrációban szerepet játszó molekula. Hipotézisünk igazolása érdekében *in vivo* chorioallantois membránon fenntartott szervtenyészetet és *in vitro* sejtmigrációs tesztet ötvöztünk olyan ellenanyagok alkalmazásával, amelyek képesek funkció blokkoló molekulaként meggátolni a felismert antigénjük működését (Chung & Lillehoj, 1991; George-Weinstein et al., 1997; Plett et al., 2002; Zhao et al., 2011). *In vivo* kísérletünk során, az embrionális bursa Fabricii mesenchymájába injektált 7H3 ellenanyag megakadályozta a lymphoid follikulusok kialakulását (Fejszák et al., 2022). Kísérletes eredményünk megegyezik azokkal a megfigyelésekkel, ahol a follikulogenezis időszakában gátolt volt a B lymphocyta prekurzorok belépése a fejlődő hámbimbóba, ezért csak kevés számú, csökevényes bursai follikulus alakult ki (Laparidou et al., 2020; Nagy et al., 2020; Lee et al., 2022). *In vivo* kísérletünk alapján elmondható, hogy a 7H3

ellenanyag funkció blokkoló hatása megzavarta a 7H3+ prebursalis B lymphocyták migrációját, befolyásolva ezáltal a follikulogenezis normál folyamatát.

Tekintettel arra, hogy a 7H3 és a CXCR4 molekulák expressziója hasonló az embrionális bursa Fabricii-ben, a 7H3 antigén sejtmigrációban betöltött szerepét tovább vizsgáltuk *in vitro* sejtmigrációs tesztek alkalmazásával. Korábbi *in vitro* és *in vivo* kísérletek alátámasztják, hogy a CXCR4 receptort expresszáló egér csontvelői B lymphocyta progenitorok, valamint az A20-as (egér B sejtes lymphoma sejtvonal) és DT40-es (csirke bursalis lymphoma sejtvonal) sejtvonalak sejtjei aktívan vándorolnak a CXCL12 irányába (D'Apuzzo et al., 1997; Humpert et al., 2014; Kim et al., 2016). Az *in vitro* sejtmigrációs kísérletünk során, a sejttenyésztő médiumba helyezett embrionális bursa redőkből, a CXCL12 kemoattraktáns hatására jelentős mennyiségű 7H3+/CXCR4+ B lymphocyta vándorolt ki a fibronektinnel kezelt felszínre. A kemoattraktáns jelenlétében hozzáadott 7H3 ellenanyag hatására viszont a kivándorló sejtek száma szignifikánsan csökkent. A 7H3 ellenanyag gátolta a CXCR4+ B lymphocyták CXCL12 irányította migrációját. *In vitro* sejtmigrációs tesztünk eredményei szintén alátámasztják, hogy a 7H3 antigén elengedhetetlen szerepet tölt be a prebursalis B lymhpocyták migrációjában, és így közvetlenül befolyásolja a fejlődő bursa telep lymphoid prekurzorok általi kolonizációját, valamint későbbi follikulogenezisét is.

A bursa Fabricii kéregállományi B lymphocytáin expresszálódó 7H3 antigén migrációban betöltött szerepét a velünk együttműködő müncheni kutatócsoport áramlási citometriás elemzésekkel kapott eredményei is alátámasztják. Az említett vizsgálatok segítségével felnőtt csirke bursából két, a 7H3 antigént eltérő intenzitással (közepes: $7H3^{med}$ és alacsony: $7H3^{low}$) expresszáló B lymphocyta csoport azonosítható: egy $7H3^{low}/chB6^{high}$ és egy $7H3^{med}/chB6^{med}$ csoport (Fejszák et al., 2022). A $7H3^{low}/chB6^{high}$ alcsoport $CXCR4^{low}$ és $CXCR4^{high}$ sejteket is tartalmaz, viszont a $7H3^{med}/chB6^{med}$ sejtekben a CXCR4 receptor expressziója egységesen alacsony vagy hiányzik. Az áramlási citometriás mérésekből származó adatok alapján feltételezzük, hogy a 7H3 antigén azokon a bursalis B lymphocytákon fejeződik ki, amelyek közvetlenül kivándorolnak a follikulusok kéregállományának kapilláris hálózatán keresztül. Hipotézisünket alátámasztja korábbi megfigyelésünk, miszerint a bursából kivándorló, valamennyi B lymphocyta egységesen $CXCR4^{low}$ fenotípust mutat (Nagy et al., 2020). Mivel az áramlási citometriás mérések azt is igazolták, hogy a perifériás keringésben lévő

chB6+ B lymphocyták ugyancsak expresszálják a 7H3 antigént, feltételezzük, hogy a frissen kivándorolt kérgi B lymphocytákon átmenetileg megmarad a 7H3 antigén expressziója. Viszont ezt, a perifériás vérben lévő, 7H3 pozitív sejt alpopulációt nem lehet immuncitokémiai módszerrel azonosítani hagyományos hisztológiai eljárással készült vérkeneteken.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy kifejlesztettünk egy új monoklonális ellenanyagot, a 7H3-at, amely komparatív immunhisztokémiai adatok alapján a bursa Fabricii kéregállományi B lymphocytáinak egy specifikus alpopulációját jelöli. Az immunhisztokémiai eredményeink, a biokémiai tulajdonságok és a funkcionális vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a 7H3 ellenanyag által felismert antigén már a B lymphocyta prekurzor sejtek migrációjában is jelentős szerepet tölt be. Míg a 7H3 ellenanyag specifikusan T és B lymphocytákat jelöl a gyöngytyúk és a csirke nyirokszöveteiben, nem ad keresztreakciót a fürjben, a pulykában és az egérben. A 7H3 monoklonális ellenanyag lehetővé teszi, egy vadon élő madárfaj, a gyöngytyúk immunrendszerének tanulmányozását és az így kapott eredmények összehasonlíthatóak a beltenyésztett csirke törzsekben végzett immunológiai vizsgálatok eredményeivel.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kimutattuk, hogy a 7H3 nevű, egér monoklonális ellenanyag a gyöngytyúk és csirke szöveteiben lymphocytákra specifikus, sejtfelszíni antigént ismer fel. Western blot analízis alapján a 7H3 ellenanyag egyetlen polipeptid láncból álló, ~80 kDa molekulatömegű fehérjét (7H3 antigént) jelöl.

2. Immunhisztokémiai festésekkel igazoltuk, hogy a 7H3 antigén először a szikhólyag vérképző őssejtjein, majd az aorta kialakulását követően az intraembrionális vérképző helyeken jelenik meg, így az intra-aortikus redőkben és a para-aortikus régióban lokalizálódó hematopoietikus őssejtek is expresszálják.

3. A szikhólyag *in ovo* tenyésztésére egy új embriómanipulációs technikát fejlesztettünk ki, amellyel bizonyítottuk, hogy a 7H3+ vérképző őssejtek a szikhólyag vérszigeteiben keletkeznek, alátámasztva a legújabb irodalmi adatokat, melyek szerint az extraembrionális vérképzés során is kialakulnak definitív vérképző őssejtek.

4. Igazoltuk, hogy a bursa Fabricii organogenezise során az embrionális bursa telepet kolonizáló B lymphocyta prekurzorok hordozzák a 7H3 antigént, és a kikelés előtt valamennyi bursalis B lymphocyta 7H3 pozitivitást mutat. A kikelést követően viszont a 7H3 antigén expressziója lecsökken és csak a kéregállományi B lymphocyták egy alpopulációján, a kapillárisok körül csoportosulva marad fenn.

5. Kimutattuk, hogy a sejtmigrációt szabályozó CXCR4 receptor felnőtt csirke és gyöngytyúk bursai follikulusainak kérgi B lymphocytáin heterogén módon expresszálódik: az alacsony ($CXCR^{low}$) expressziót mutató B lymphocyták a kéreg-velő határ közelében, míg a magas CXCR4 expressziót ($CXCR^{high}$) mutató sejtek a külső kéregállományi területen lokalizálódnak. Kettős jelöléssel igazoltuk, hogy a 7H3 antigén expressziója a $CXCR4^{low}$ B lymphocytákra jellemző.

6. *In vivo* és *in vitro* kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a 7H3 ellenanyag funkció blokkoló hatást kifejtve gátolja a B lymphocyták migrációját és a lymphoid follikulusok kolonizációját.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A bursa Fabricii a madarak jellemző primer lympho-epitheliális nyirokszerve, ahol a B lymphocyták differenciálódása zajlik. Funkciójának 1956-os felfedezése jelentősen hozzájárult az immunológia robbanásszerű fejlődéséhez. Mivel a mono- és poliklonális ellenanyagok elsősorban csirke eredetű antigének ellen készültek, a madár immunológia szinte egyenlő a házityúkra vonatkozó ismereteinkkel. A vadon élő madarak immunrendszere ellenállóbb, a nyirokszervek szöveti szerkezete differenciáltabb, mint a beltenyésztett házimadarak lympho-myeloid szervei, ezért immunsejtjeiknek karakterizálása, ontogenezisüknek nyomon követése az immunrendszer funkciójának jobb megértéséhez vezethet. Munkám során egy új, gyöngytyúk és csirke lymphocytái által expresszált 80 kDa-os antigént felismerő egér monoklonális ellenanyag (klón neve: 7H3) immunhisztokémiai, biokémiai és funkcionális karakterizálását végeztem el.

A 7H3 ellenanyag felnőtt állatokban az éretlen és érett T lymphocytákat egyaránt jelöli, míg a bursa Fabricii follikulusaiban specifikusan egy corticalis B lymphocyta populációt ismer fel. A korai embrionális fejlődés során az első 7H3+ sejtek a gyöngytyúk embrió szikhólyagjának vérszigeteiben jelennek meg, majd később az intraembrionális vérképző őssejtek is kifejezik a 7H3 ellenanyag által jelölt antigént (7H3 antigén). A fejlődő bursa Fabricii telepét kolonizáló CD45+/chB6+ B lymphocyta prekurzorok expresszálják a 7H3 antigént, amely embrionálisan valamennyi bursalis B lymphocyta felszínén jelen van. A kikelést követően a bursai follikulusok 7H3 immunreaktivitása fokozatosan csökken, de megmarad a corticalis B lymphocyták egy alpopulációján. Kettős immunjelöléssel igazoltuk, hogy a 7H3+ B lymphocyták a follikulusok cortexének belső részében lokalizálódnak, ahol a sejtek a CXCR4 receptor alacsony szintű expresszióját ($CXCR4^{low}$) mutatják. A 7H3+/$CXCR4^{low}$ sejtek corticalis kapillárisok közelében történő csoportos megjelenése egybeesik azzal az időponttal, amikor a B lymphocyták elhagyják a bursa Fabriciit és a perifériás nyirokszerveket kolonizálják. Funkció blokkoló ellenanyagokkal végzett *in vitro* és *in vivo* vizsgálataink szerint, a 7H3 antigén gátlása zavart okoz a CXCR4+ B lymphocyták CXCL12 kemokin ligand által irányított migrációjában.

Eredményeink összefoglalva igazolják, hogy a 7H3 és CXCR4 molekulák expressziója a kérgi B lymphocyták különböző érési fázisait kísérik és befolyásolják az aktív sejtmigrációt. A 7H3 ellenanyag egy igen értékes immunológiai markerként szolgál a madár B lymphocyták ontogenezisének vizsgálatában.

9. SUMMARY

Bursa of Fabricius is an avian primary lympho-epithelial organ, where the differentiation of B lymphocytes occurs. The discovery of its function in 1956 significantly contributed to the explosive development of immunology. Since the mono- and polyclonal antibodies were raised primarily against chicken antigens, the avian immunology is almost equal with our knowledge about the chicken. Immune system of wild birds is more resilient, the histological structure of the lymphoid organs is more differentiated than the lympho-myeloid organs of the inbred domesticated birds; therefore, the characterization of their immune cells and the monitoring of their ontogenesis can lead to a better understanding of the function of the immune system. During my PhD studies I have performed multiple immunocytochemical, biochemical and functional characterization of a novel mouse monoclonal antibody (clone name: 7H3) specific to an 80 kDa antigen expressed by lymphocytes of guinea fowl and chicken.

In adult bird both immature and mature T lymphocytes were labelled by 7H3 antibody, while in the follicles of the bursa of Fabricius a subpopulation of cortical B lymphocytes were labelled specifically. During early embryogenesis the first 7H3+ cells appear in the yolk sac blood islands of the guinea fowl embryo and later, the intraembryonic hematopoietic stem cells also express 7H3 antigen. CD45+/chB6+ B lymphocyte precursors colonizing the primordium of the developing bursa of Fabricius also express 7H3 antigen, which is present on the surface of all bursal B lymphocytes during the embryonic life. After hatching the 7H3 immunreactivity of the bursal follicles gradually diminishes, but remains in a subpopulation of the cortical B lymphocytes. Using double immunostaining we showed that 7H3+ B lymphocytes are localized in the inner part of the follicular cortex, where the cells show low expression level of the receptor CXCR4 ($CXCR4^{low}$). The cluster appearance of 7H3+/$CXCR4^{low}$ cells near cortical capillaries coincides with the time when B lymphocytes emigrate from the bursa and colonize the peripheral lymphatic organs. *In vitro* and *in vivo* experiments performed with functional blocking antibodies demonstrated that the inhibition of 7H3 antigen prevents the migration of CXCR4+ B lymphocytes directed by CXCL12 chemokine.

Our results confirm it in summary that the expression of 7H3 and CXCR4 molecules accompanies various maturation phases of B lymphocytes, influencing their active cell migration. 7H3 antibody will serve as a very valuable immunological marker for studying the ontogeny of avian B lymphocytes.

10. IRODALOMJEGYZÉK

Abbate, F., Pfarrer, C., Jones, C. J. P., Ciriaco, E., Germanà, G., & Leiser, R. (2007). Age-dependent changes in the pigeon bursa of Fabricius vasculature: a comparative study using light microscopy and scanning electron microscopy of vessel casts. Journal of Anatomy, 211(3), 387–398. https://doi.org/10.1111/J.1469-7580.2007.00763.X

Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T., & Gutierrez-Ramos, J. C. (1997). The Chemokine SDF-1 Is a Chemoattractant for Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells and Provides a New Mechanism to Explain the Mobilization of CD34+ Progenitors to Peripheral Blood. Journal of Experimental Medicine, 185(1), 111–120. https://doi.org/10.1084/JEM.185.1.111

al Barashdi, M. A., Ali, A., McMullin, M. F., & Mills, K. (2021). Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45). Journal of Clinical Pathology, 74(9), 548–552. https://doi.org/10.1136/JCLINPATH-2020-206927

Alais, S., Allioli, N., Pujades, C., Duband, J. L., Vainio, O., Imhof, B. A., & Dunon, D. (2001). HEMCAM/CD146 downregulates cell surface expression of (β)1 integrins. Journal of Cell Science, 114(10), 1847–1859. https://doi.org/10.1242/JCS.114.10.1847

Allen, C. D. C., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., & Cyster, J. G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. Nature Immunology 2004 5:9, 5(9), 943–952. https://doi.org/10.1038/ni1100

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., & 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(OCT). https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02495

Batsivari, A., Rybtsov, S., Souilhol, C., Binagui-Casas, A., Hills, D., Zhao, S., Travers, P., & Medvinsky, A. (2017). Understanding Hematopoietic Stem Cell Development through Functional Correlation of Their Proliferative Status with the Intra-aortic Cluster

Architecture. Stem Cell Reports, 8(6), 1549–1562. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.003

Beck, T. C., Gomes, A. C., Cyster, J. G., & Pereira, J. P. (2014). CXCR4 and a cell-extrinsic mechanism control immature B lymphocyte egress from bone marrow. Journal of Experimental Medicine, 211(13), 2567–2581. https://doi.org/10.1084/JEM.20140457/VIDEO-6

Bertrand, J. Y., Chi, N. C., Santoso, B., Teng, S., Stainier, D. Y. R., & Traver, D. (2010). Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. Nature 2010 464:7285, 464(7285), 108–111. https://doi.org/10.1038/nature08738

Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A., & Springer, T. A. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). Journal of Experimental Medicine, 184(3), 1101–1109. https://doi.org/10.1084/JEM.184.3.1101

Bockman, D. E., Boydston, W. R., & Beezhold, D. H. (1983). THE ROLE OF EPITHELIAL CELLS IN GUT-ASSOCIATED IMMUNE REACTIVITY*. Annals of the New York Academy of Sciences, 409(1), 129–144. https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1983.TB26864.X

Bódi, I., Minkó, K., Fölker, O., Benyeda, Z., Felföldi, B., Magyar, A., Kiss, A., Palya, V., & Oláh, I. (2018). Expression of caveolin-1 in the interfollicular but not the follicle-associated epithelial cells in the bursa of fabricius of chickens. Journal of Morphology, 279(1), 17–26. https://doi.org/10.1002/JMOR.20749

Bódi, I., Nagy, N., Sinka, L., Igyártó, B. Z., & Oláh, I. (2009). Novel monoclonal antibodies recognise guinea fowl thrombocytes. Acta Veterinaria Hungarica, 57(2), 239–246. https://doi.org/10.1556/AVET.57.2009.2.5

Boyden, E. A. (1922). The development of the cloaca in birds, with special reference to the origin of the bursa of fabricius, the formation of a urodaeal sinus, and the regular occurrence of a cloacal fenestra. American Journal of Anatomy, 30(2), 163–201. https://doi.org/10.1002/AJA.1000300202

Carlson, L. M., Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Masteller, E. L., Hurley, E. A., McCormack, W. T., Baltimore, D., & Thompson, C. B. (1991). Selective expression of RAG-2 in chicken B cells undergoing immunoglobulin gene conversion. Cell, 64(1), 201–208. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90221-J

Chung, K. S., & Lillehoj, H. S. (1991). Development and functional characterization of monoclonal antibodies recognizing chicken lymphocytes with natural killer cell activity. Veterinary Immunology and Immunopathology, 28(3–4), 351–363. https://doi.org/10.1016/0165-2427(91)90126-W

Ciau-Uitz, A., Walmsley, M., & Patient, R. (2000). Distinct origins of adult and embryonic blood in Xenopus. Cell, 102(6), 787–796. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00067-2

Cooper, M. D., Cain, W. A., van Alten, P. J., & Good, R. A. (1969). Development and function of the immunoglobulin producing system. I. Effect of bursectomy at different stages of development on germinal centers, plasma cells, immunoglobulins and antibody production. International Archives of Allergy and Applied Immunology, 35(3), 242–252. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4179663/

Cooper, M. D., Peterson, R. D. A., & Good, R. A. (1965). DELINEATION OF THE THYMIC AND BURSAL LYMPHOID SYSTEMS IN THE CHICKEN. Nature, 205(4967), 143–146. https://doi.org/10.1038/205143A0

Cuadros, M. A., Coltey, P., Nieto, M. C., & Martin, C. (1992). Demonstration of a phagocytic cell system belonging to the hemopoietic lineage and originating from the yolk sac in the early avian embryo. Development (Cambridge, England), 115(1), 157–168. https://doi.org/10.1242/DEV.115.1.157

Damoiseaux, J. G. M. C., Yagita, H., Okumura, K., & van Breda Vriesman, P. J. C. (1998). Costimulatory molecules CD80 and CD86 in the rat; tissue distribution and expression by antigen-presenting cells. Journal of Leukocyte Biology, 64(6), 803–809. https://doi.org/10.1002/JLB.64.6.803

D'Apuzzo, M., Rolink, A., Loetscher, M., Hoxie, J. A., Clark-Lewis, I., Melchers, F., Baggiolini, M., & Moser, B. (1997). The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. European Journal of Immunology, 27(7), 1788–1793. https://doi.org/10.1002/EJI.1830270729

Dar, A., Schajnovitz, A., Lapid, K., Kalinkovich, A., Itkin, T., Ludin, A., Kao, W. M., Battista, M., Tesio, M., Kollet, O., Cohen, N. N., Margalit, R., Buss, E. C., Baleux, F., Oishi, S., Fujii, N., Larochelle, A., Dunbar, C. E., Broxmeyer, H. E., … Lapidot, T. (2011). Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and catecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells. Leukemia, 25(8), 1286. https://doi.org/10.1038/LEU.2011.62

Delassus, S., & Cumano, A. (1996). Circulation of hematopoietic progenitors in the mouse embryo. Immunity, 4(1), 97–106. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80302-7

Dieterlen-Lievre, F. (1975). On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 33(3), 607–619. https://doi.org/10.1242/dev.33.3.607

Dieterlen-Lièvre, F., Pouget, C., Bollérot, K., & Jaffredo, T. (2006). Are Intra-Aortic Hemopoietic Cells Derived from Endothelial Cells During Ontogeny? Trends in Cardiovascular Medicine, 16(4), 128–139. https://doi.org/10.1016/J.TCM.2006.02.005

Dolfi, A., Giannessi, F., Bianchi, F., & Lupetti, M. (1988). Distribution of esterase activity at the level of the epithelium of the diffusely infiltrated area (DIA) and of the cloaca in the Gallus domesticus: An ultrastructural study. The Anatomical Record, 221(1), 469–474. https://doi.org/10.1002/AR.1092210103

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

Downs, K. M. (2003). Florence Sabin and the Mechanism of Blood Vessel Lumenization During Vasculogenesis. Microcirculation, 10(1), 5–25. https://doi.org/10.1038/SJ.MN.7800171

Dunon, D., Allioli, N., Vainio, O., Ody, C., & Imhof, B. A. (1999). Quantification of T-Cell Progenitors During Ontogeny: Thymus Colonization Depends on Blood Delivery of Progenitors. Blood, 93(7), 2234–2243. https://doi.org/10.1182/BLOOD.V93.7.2234

Ekino, S., Matsuno, K., & Kotani, M. (1979). Distribution and role of lymph vessels of the bursa Fabricii. Lymphology, 12(4), 247–252.

Fejszák, N., Kocsis, K., Halasy, V., Szőcs, E., Soós, Á., Roche, D. von la, Härtle, S., & Nagy, N. (2022). Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a B cell subpopulation in bursa of Fabricius. Poultry Science, 101(4), 101711. https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2022.101711

Felföldi, B., Imre, G., Igyártó, B., Iván, J., Mihalik, R., Lackó, E., Oláh, I., & Magyar, A. (2005). In ovo vitelline duct ligation results in transient changes of bursal microenvironments. Immunology, 116(2), 267–275. https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2005.02221.X

Fellah, J. S., Jaffredo, T., Nagy, N., & Dunon, D. (2014). Development of the Avian Immune System. Avian Immunology: Second Edition, San Diego, USA: Academic Press 2014, 45–63. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396965-1.00003-0

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., & Berger, E. A. (1996). HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. Science, 272(5263), 872–877. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.272.5263.872

Garceau, V., Balic, A., Garcia-Morales, C., Sauter, K. A., McGrew, M. J., Smith, J., Vervelde, L., Sherman, A., Fuller, T. E., Oliphant, T., Shelley, J. A., Tiwari, R., Wilson, T. L., Chintoan-Uta, C., Burt, D. W., Stevens, M. P., Sang, H. M., & Hume, D. A. (2015). The development and maintenance of the mononuclear phagocyte system of the chick is controlled by signals from the macrophage colony-stimulating factor receptor. BMC Biology, 13(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/S12915-015-0121-9

George-Weinstein, M., Gerhart, J., Blitz, J., Simak, E., & Knudsen, K. A. (1997). N-cadherin Promotes the Commitment and Differentiation of Skeletal Muscle Precursor Cells. Developmental Biology, 185(1), 14–24. https://doi.org/10.1006/DBIO.1997.8542

Gerhart, J., Neely, C., Pfautz, J., & George-Weinstein, M. (2008). Tracking and ablating subpopulations of epiblast cells in the chick embryo. Biological Procedures Online, 10(1), 74–82. https://doi.org/10.1251/BPO145/METRICS

Gitlin, A. D., & Nussenzweig, M. C. (2015). Immunology: Fifty years of B lymphocytes. Nature, 517(7533), 139–141. https://doi.org/10.1038/517139A

Glick, B. (1988). Bursa of Fabricius: development, growth, modulation, and endocrine function. CRC Critic Poultr Biol., 1, 107–131.

Glick, B. (1994). The Bursa of Fabricius: The Evolution of a Discovery. Poultry Science, 73(7), 979–983. https://doi.org/10.3382/PS.0730979

Glick, B., Chang, T. S., & Jaap, R. G. (1956). The Bursa of Fabricius and Antibody Production. Poultry Science, 35(1), 224–225. https://doi.org/10.3382/PS.0350224

Godin, I., & Cumano, A. (2003). Of birds and mice: hematopoietic stem cell development. International Journal of Developmental Biology, *49*(2–3), 251–257. https://doi.org/10.1387/IJDB.041945IG

Godin, I., Dieterlen-Lièvre, F., & Cumano, A. (1995). Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(3), 773. https://doi.org/10.1073/PNAS.92.3.773

Goitsuka, R., Chen, C. L. H., Benyon, L., Asano, Y., Kitamura, D., & Cooper, M. D. (2007). Chicken cathelicidin-B1, an antimicrobial guardian at the mucosal M cell gateway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(38), 15063–15068. https://doi.org/10.1073/PNAS.0707037104

Guinamard, R., Signoret, N., Masamichi, I., Marsh, M., Kurosaki, T., & Ravetch, J. v. (1999). B Cell Antigen Receptor Engagement Inhibits Stromal Cell–derived Factor

(SDF)-1α Chemotaxis and Promotes Protein Kinase C (PKC)-induced Internalization of CXCR4. Journal of Experimental Medicine, 189(9), 1461–1466. https://doi.org/10.1084/JEM.189.9.1461

Gumati, M. K., Magyar, A., Nagy, N., Kurucz, É., Felföldi, B., & Oláh, I. (2003). Extracellular matrix of different composition supports the various splenic compartments of guinea fowl (Numida meleagris). Cell and Tissue Research, 312(3), 333–343. https://doi.org/10.1007/S00441-003-0736-Y

Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. Developmental Dynamics, 195(4), 231–272. https://doi.org/10.1002/AJA.1001950404

Härtle, S., Magor, K. E., Göbel, T. W., Davison, F., & Kaspers, B. (2022). Structure and evolution of avian immunoglobulins. Avian Immunology: Third Edition, San Diego, USA: Academic Press 2022, 101–119. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818708-1.00023-3

Hayashi, Y., & Miki, N. (1985). Purification and characterization of a neurite outgrowth factor from chicken gizzard smooth muscle. The Journal of Biological Chemistry, 260(26), 14269–14278. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)38713-6

Houssaint, E., Diez, E., & Pinktt, J. R. L. (1987). Ontogeny and tissue distribution of the chicken Bu-1a antigen. Immunology, 62(3), 463-70. PMID: 3499381; PMCID: PMC1454130.

Houssaint, E., Lassila, O., & Vainio, O. (1989). Bu-1 antigen expression as a marker for B cell precursors in chicken embryos. European Journal of Immunology, 19(2), 239–243. https://doi.org/10.1002/EJI.1830190204

Houssaint, E., Mansikka, A., & Vainio, O. (1991). Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo. Journal of Experimental Medicine, 174(2), 397–406. https://doi.org/10.1084/JEM.174.2.397

Hu, T., Wu, Z., Bush, S. J., Freem, L., Vervelde, L., Summers, K. M., Hume, D. A., Balic, A., & Kaiser, P. (2019). Characterization of Subpopulations of Chicken Mononuclear

Phagocytes That Express TIM4 and CSF1R. The Journal of Immunology, 202(4), 1186–1199. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1800504

Huang, H., Zettergren, L. D., & Auerbach, R. (1994). In vitro differentiation of B cells and myeloid cells from the early mouse embryo and its extraembryonic yolk sac. Experimental Hematology, 22(1), 19–25. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8282055/

Humpert, M. L., Pinto, D., Jarrossay, D., & Thelen, M. (2014). CXCR7 influences the migration of B cells during maturation. European Journal of Immunology, 44(3), 694–705. https://doi.org/10.1002/EJI.201343907

Igyártó, B. Z., Nagy, N., Magyar, A., & Oláh, I. (2008). Identification of the Avian B-Cell-Specific Bu-1 Alloantigen by a Novel Monoclonal Antibody. Poultry Science, 87(2), 351–355. https://doi.org/10.3382/PS.2007-00365

Jaffredo, T., Gautier, R., Brajeul, V., & Dieterlen-Lièvre, F. (2000). Tracing the Progeny of the Aortic Hemangioblast in the Avian Embryo. Developmental Biology, 224(2), 204–214. https://doi.org/10.1006/DBIO.2000.9799

Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A., & Dieterlen-Lièvre, F. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. Development, 125(22), 4575–4583. https://doi.org/10.1242/DEV.125.22.4575

Jaffredo, T., Richard, C., Pouget, C., Teillet, M. A., Bollérot, K., Gautier, R., & Drevon, C. (2010). Aortic remodelling during hemogenesis: is the chicken paradigm unique? International Journal of Developmental Biology, 54(6–7), 1045–1054. https://doi.org/10.1387/IJDB.103062TJ

Jaffredo, T., & Yvernogeau, L. (2014). How the avian model has pioneered the field of hematopoietic development. Experimental Hematology, 42(8), 661–668. https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2014.05.009

Johnson, J. P. (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. Cancer Metastasis Reviews, 18(3), 345–357. https://doi.org/10.1023/A:1006304806799

Kaiser, L. M., Hunter, Z. R., Treon, S. P., & Buske, C. (2020). CXCR4 in Waldenström's Macroglobulinema: chances and challenges. Leukemia 2020 35:2, 35(2), 333–345. https://doi.org/10.1038/s41375-020-01102-3

Kaiser, P., & Balic, A. (2015). The Avian Immune System. Sturkie's Avian Physiology: Sixth Edition, San Diego, USA: Academic Press 2015, 403–418. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407160-5.00017-8

Karpova, D., & Bonig, H. (2015). Concise Review: CXCR4/CXCL12 Signaling in Immature Hematopoiesis--Lessons From Pharmacological and Genetic Models. Stem Cells (Dayton, Ohio), 33(8), 2391–2399. https://doi.org/10.1002/STEM.2054

Kim, B., Takeuchi, A., Hikida, M., & Matsuoka, S. (2016). Roles of the mitochondrial Na+-Ca2+ exchanger, NCLX, in B lymphocyte chemotaxis. Scientific Reports, 6. https://doi.org/10.1038/SREP28378

Kim, I.-J., You, S. K., Kim, H., Yeh, H.-Y., & Sharma, J. M. (2000). Characteristics of Bursal T Lymphocytes Induced by Infectious Bursal Disease Virus. Journal of Virology, 74(19), 8884–8892. https://doi.org/10.1128/JVI.74.19.8884-8892.20001998

Kim, S., & Zhang, L. (2005). Identification of naturally secreted soluble form of TL1A, a TNF-like cytokine. Journal of Immunological Methods, 298(1–2), 1–8. https://doi.org/10.1016/J.JIM.2004.12.019

Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., Busch-Nentwich, E., Dahm, R., Frohnhöfer, H. G., Geiger, H., Gilmour, D., Holley, S., Hooge, J., Jülich, D., Maderspacher, F., Maischein, H. M., Neumann, C., Nicolson, T., Roehl, H., Schönberger, U., Seiler, C., Söllner, C., … Nüsslein-Volhard, C. (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. Nature 2003 421:6920, 421(6920), 279–282. https://doi.org/10.1038/nature01338

Ko, K. H., Lee, I. K., Kim, G., Gu, M. J., Kim, H. Y., Park, B. C., Park, T. S., Han, S. H., & Yun, C. H. (2018). Changes in bursal B cells in chicken during embryonic development and early life after hatching. Scientific Reports 2018 8:1, 8(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34897-4

Kothlow, S., Morgenroth, I., Graef, Y., Schneider, K., Riehl, I., Staeheli, P., Schneider, P., & Kaspers, B. (2007). Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken. International Immunology, 19(2), 203–215. https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXL137

Lacaud, G., & Kouskoff, V. (2017). Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. Experimental Hematology, 49, 19–24. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.12.009

Lampisuo, M., Arstila, T. P., Liippo, J., & Lassila, O. (1998). Expression of chL12 Surface Antigen is Associated with Cell Survival in the Avian Bursa of Fabricius. Scandinavian Journal of Immunology, 47(3), 223–228. https://doi.org/10.1046/J.1365-3083.1998.00291.X

Laparidou, M., Schlickenrieder, A., Thoma, T., Lengyel, K., & 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. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.03057

Lapidot, T., & Kollet, O. (2002). The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2mnull mice. Leukemia 2002 16:10, 16(10), 1992–2003. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402684

Lassila, O. (1989). Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius. European Journal of Immunology, 19(5), 955–958. https://doi.org/10.1002/EJI.1830190527

Lassila, O., & Eskola, J. (1979). PREBURSAL STEM CELLS IN THE INTRAEMBRYONIC MESENCHYME OF THE CHICK EMBRYO AT 7 DAYS OF INCUBATION. J. Immunol 123(5):2091-4. https://doi.org/10.4049/jimmunol.123.5.2091

le Douarin, N. M., Houssaint, E., Jotereau, F. v., & Belo, M. (1975). Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through

interspecific chimeras. Proceedings of the National Academy of Sciences, 72(7), 2701–2705. https://doi.org/10.1073/PNAS.72.7.2701

Lee, K. Y., Choi, H. J., Park, K. J., Woo, S. J., Kim, Y. M., & Han, J. Y. (2022). Development and characterization of a CRISPR/Cas9-mediated RAG1 knockout chicken model lacking mature B and T cells. Frontiers in Immunology, 13, 892476. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.892476

Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Jang, S. I., Lee, K. W., Baldwin, C., Tompkins, D., Wagner, B., del Cacho, E., Lillehoj, E. P., & Hong, Y. H. (2012). Development and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive with chicken CD83. Veterinary Immunology and Immunopathology, 145(1–2), 527–533. https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2011.11.020

Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Jeong, M., del Cacho, E., Min, W., Sullivan, Y. B., Kakach, L., LaBresh, J. W., Kim, H. R., & Chune, H. K. (2014). Development and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive with chicken TL1A. Veterinary Immunology and Immunopathology, 159(1–2), 103–109. https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2014.01.002

Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Park, M. S., Baldwin, C., Tompkins, D., Wagner, B., del Cacho, E., Babu, U., & Min, W. (2011). Development and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive with chicken CD80. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 34(3), 273–279. https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2011.01.003

Liang, T. S., Hartt, J. K., Lu, S., Martins-Green, M., Gao, J.-L., & Murphy, P. M. (2001). Cloning, mRNA distribution, and functional expression of an avian counterpart of the chemokine receptor/HIV coreceptor CXCR4. Journal of Leukocyte Biology, 69(2), 297–305. https://doi.org/10.1189/JLB.69.2.297

Lin, Y., Yoder, M. C., & Yoshimoto, M. (2014). Lymphoid Progenitor Emergence in the Murine Embryo and Yolk Sac Precedes Stem Cell Detection. Stem Cells and Development, 23(11), 1168. https://doi.org/10.1089/SCD.2013.0536

Lippincott-Schwartz, J., & Fambrough, D. M. (1987). Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: Kinetic and morphological analysis. Cell, 49(5), 669–677. https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90543-5

Liu, C. P., & Auerbach, R. (1991). In vitro development of murine T cells from prethymic and preliver embryonic yolk sac hematopoietic stem cells. Development, 113(4), 1315–1323. https://doi.org/10.1242/DEV.113.4.1315

Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., & Moser, B. (1994). Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. The Journal of Biological Chemistry, 269(1), 232–237. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)42339-8

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. Anatomischer Anzeiger, 162(2), 83–92. https://europepmc.org/article/med/3789415

Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kismimoto, T., Bronson, R. T., & Springer, T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(16), 9448–9453. https://doi.org/10.1073/PNAS.95.16.9448

Madej, J. P., Chrzaogonekstek, K., Piasecki, T., & Wieliczko, A. (2013). New Insight into the Structure, Development, Functions and Popular Disorders of Bursa Fabricii. Anatomia, Histologia, Embryologia, 42(5), 321–331. https://doi.org/10.1111/AHE.12026

Mandal, M., Okoreeh, M. K., Kennedy, D. E., Maienschein-Cline, M., Ai, J., McLean, K. C., Kaverina, N., Veselits, M., Aifantis, I., Gounari, F., & Clark, M. R. (2019). CXCR4 signaling directs Igk recombination and the molecular mechanisms of late B lymphopoiesis. Nature Immunology 2019 20:10, 20(10), 1393–1403. https://doi.org/10.1038/s41590-019-0468-0

Mansikka, A., Sandberg, M., Lassila, O., & Toivanen, P. (1990). Rearrangement of immunoglobulin light chain genes in the chicken occurs prior to colonization of the embryonic bursa of Fabricius. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(23), 9416–9420. https://doi.org/10.1073/PNAS.87.23.9416

Mast, J., Goddeeris, B. M., Peeters, K., Vandesande, F., & Berghman, L. R. (1998). Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. Veterinary Immunology and Immunopathology, 61(2–4), 343–357. https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00152-9

Masteller, E. L., Larsen, R. D., Carlson, L. M., Pickel, J. M., Nickoloff, B., Lowe, J., Thompson, C. B., & Lee, K. P. (1995a). 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. https://doi.org/10.1242/DEV.121.6.1657

Masteller, E. L., Lee, K. P., Carlson, L. M., & Thompson, C. B. (1995b). Expression of sialyl Lewis(x) and Lewis(x) defines distinct stages of chicken B cell maturation. The Journal of Immunology, 155(12), 5550–5556. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.155.12.5550

Masteller, E. L., & Thompson, C. B. (1994). B Cell Development in the Chicken. Poultry Science, 73(7), 998–1011. https://doi.org/10.3382/PS.0730998

Mcheik, S., van Eeckhout, N., de Poorter, C., Galés, C., Parmentier, M., & Springael, J. Y. (2019). Coexpression of CCR7 and CXCR4 During B Cell Development Controls CXCR4 Responsiveness and Bone Marrow Homing. Frontiers in Immunology, 10, 2970. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02970

McNagny, K. M., Pettersson, I., Rossi, F., Flamme, I., Shevchenko, A., Mann, M., & Graf, T. (1997). Thrombomucin, a Novel Cell Surface Protein that Defines Thrombocytes and Multipotent Hematopoietic Progenitors. Journal of Cell Biology, 138(6), 1395–1407. https://doi.org/10.1083/JCB.138.6.1395

Medeiros, N. C., Porto, F. L., de Menezes, C. A., dos Santos Reis, M. D., Smaniotto, S., & Lins, M. P. (2021). CXCL12-driven thymocyte migration is increased by thymic epithelial cells treated with prolactin in vitro. Journal of Biosciences, 46(4). https://doi.org/10.1007/S12038-021-00229-4

Medvinsky, A., & Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. Cell, 86(6), 897–906. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80165-8

Minko, K., Bollerot, K., Drevon, C., Hallais, M. F., & Jaffredo, T. (2003). From mesoderm to blood islands: patterns of key molecules during yolk sac erythropoiesis. Gene Expression Patterns, 3(3), 261–272. https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00053-X

Minkó, K. (2005). Molecular aspects of haematopoietic stem cell emergence in the avian embryo. Semmelweis Egyetem Doktori Iskola, Budapest; 537. Doktori Értekezés.

Moore, M. A. S., & Owen, J. J. T. (1965). Chromosome Marker Studies on the Development of the Haemopoietic System in the Chick Embryo. Nature 1965 208:5014, 208(5014), 956–956. https://doi.org/10.1038/208956a0

Nagai, H., & Sheng, G. (2008). Definitive erythropoiesis in chicken yolk sac. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 237(11), 3332–3341. https://doi.org/10.1002/DVDY.21746

Nagai, H., Shin, M., Weng, W., Nakazawa, F., Jakt, L. M., Alev, C., & Sheng, G. (2018). Early hematopoietic and vascular development in the chick. International Journal of Developmental Biology, 62(1-2–3), 137–144. https://doi.org/10.1387/IJDB.170291GS

Nagasawa, T. (2014). CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. Journal of Molecular Medicine, 92(5), 433–439. https://doi.org/10.1007/S00109-014-1123-8

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S. I., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., & Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and

bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature 1996 382:6592, 382(6592), 635–638. https://doi.org/10.1038/382635a0

Nagy, N., Bódi, I., & Oláh, I. (2016). Avian dendritic cells: Phenotype and ontogeny in lymphoid organs. Developmental and Comparative Immunology, 58, 47–59. https://doi.org/10.1016/J.DCI.2015.12.020

Nagy, N., Busalt, F., Halasy, V., Kohn, M., Schmieder, S., Fejszak, N., Kaspers, B., & Härtle, S. (2020). In and Out of the Bursa—The Role of CXCR4 in Chicken B Cell Development. Frontiers in Immunology, 11, 1468. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01468

Nagy, N., Magyar, A., Khalifa Gumati, M., Ola, I., & OlA, I. (2001). Development of the Follicle-Associated Epithelium and the Secretory Dendritic Cell in the Bursa of Fabricius of the Guinea Fowl (Numida Meleagris) Studied by Novel Monoclonal Antibodies. THE ANATOMICAL RECORD, 262, 279–292. https://doi.org/10.1002/1097-0185

Nagy, N., Magyar, A., Tóth, M., & Oláh, I. (2004a). Quail as the chimeric counterpart of the chicken: Morphology and ontogeny of the bursa of Fabricius. Journal of Morphology, 259(3), 328–339. https://doi.org/10.1002/JMOR.10199

Nagy, N., Magyar, A., Tóth, M., & Oláh, I. (2004b). Origin of the bursal secretory dendritic cell. Anatomy and Embryology, 208(2), 97–107. https://doi.org/10.1007/S00429-003-0378-6

Nagy, N., & Oláh, I. (2010). Experimental evidence for the ectodermal origin of the epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius. Development (Cambridge, England), 137(18), 3019–3023. https://doi.org/10.1242/DEV.055194

Nagy, N., Oláh, I., & Vervelde, L. (2022). Structure of the avian lymphoid system. Avian Immunology: Third Edition, San Diego, USA: Academic Press 2022, 11–44. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818708-1.00027-0

Nakazawa, F., Nagai, H., Shin, M., & Sheng, G. (2006). Negative regulation of primitive hematopoiesis by the FGF signaling pathway. Blood, 108(10), 3335–3343. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-05-021386

Naukkarinen, A., & Sorvari, T. E. (1984). Involution of the Chicken Bursa of Fabricius: A Light Microscopic Study With Special Reference to Transport of Colloidal Carbon in the Involuting Bursa. Journal of Leukocyte Biology, 35(3), 281–290. https://doi.org/10.1002/JLB.35.3.281

Nie, Y., Waite, J., Brewer, F., Sunshine, M. J., Littman, D. R., & Zou, Y. R. (2004). The Role of CXCR4 in Maintaining Peripheral B Cell Compartments and Humoral Immunity. Journal of Experimental Medicine, 200(9), 1145–1156. https://doi.org/10.1084/JEM.20041185

Oberlin, E., Tavian, M., Blazsek, I., & Péault, B. (2002). Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. Development (Cambridge, England), 129(17), 4147–4157. https://doi.org/10.1242/DEV.129.17.4147

Oláh, I., Felföldi, B., Benyeda, Z., Nagy, N., & Kovács, T. (2022). The morphology and differentiation of stromal cells in the cortex of follicles in the bursa of Fabricius of the chicken. The Anatomical Record, 305(11), 3297–3306. https://doi.org/10.1002/AR.24893

Olah, I., & Glick, B. (1978a). The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius. Poultry Science, 57(5), 1445–1450. https://doi.org/10.3382/PS.0571445

Olah, I., & Glick, B. (1978b). Secretory cell in the medulla of the bursa of Fabricius. Experientia, 34(12), 1642–1643. https://doi.org/10.1007/BF02034727

Olah, I., & Glick, B. (1987). Bursal secretory cells: An electron microscope study. The Anatomical Record, 219(3), 268–274. https://doi.org/10.1002/AR.1092190307

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. The Anatomical Record, 243(3), 384–389. https://doi.org/10.1002/AR.1092430313

Oláh, I., Glick, B., & Törö, I. (1986). Bursal development in normal and testosterone-treated chick embryos. Poultry Science, 65(3), 574–588. https://doi.org/10.3382/PS.0650574

Oláh, I., Gumati, K. H., Nagy, N., Magyar, A., Kaspers, B., & Lillehoj, H. (2002). Diverse expression of the K-1 antigen by cortico-medullary and reticular epithelial cells of the bursa of Fabricius in chicken and guinea fowl. Developmental and Comparative Immunology, 26(5), 481–488. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00094-5

Olah, I., Kendall, C., & Glick, B. (1992). Differentiation of bursal secretory-dendritic cells studied with anti-vimentin monoclonal antibody. The Anatomical Record, 233(1), 111–120. https://doi.org/10.1002/AR.1092330115

Oláh, I., & Nagy, N. (2013). Retrospection to discovery of bursal function and recognition of avian dendritic cells; past and present. Developmental and Comparative Immunology, 41(3), 310–315. https://doi.org/10.1016/J.DCI.2013.03.007

Oláh, I., Nagy, N., & Vervelde, L. (2014). Structure of the Avian Lymphoid System. Avian Immunology: Second Edition, San Diego, USA: Academic Press 2014, 11–44. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396965-1.00002-9

Olson, W. C., & Ewert, D. L. (1990). Markers of B lymphocyte differentiation in the chicken. Hybridoma, 9(4), 331–350. https://doi.org/10.1089/HYB.1990.9.331

O'Neill, S. K., Cao, Y., Hamel, K. M., Doodes, P. D., Hutas, G., & Finnegan, A. (2007). Expression of CD80/86 on B Cells Is Essential for Autoreactive T Cell Activation and the Development of Arthritis. The Journal of Immunology, 179(8), 5109–5116. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.179.8.5109

Orkin, S. H., & Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. Cell, 132(4), 631–644. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.01.025

Paramithiotis, E., & Ratcliffe, M. J. (1994a). B cell emigration directly from the cortex of lymphoid follicles in the bursa of Fabricius. European Journal of Immunology, 24(2), 458–463. https://doi.org/10.1002/EJI.1830240229

Paramithiotis, E., & Ratcliffe, M. J. (1994b). Survivors of Bursal B Cell Production and Emigration. Poultry Science, 73(7), 991–997. https://doi.org/10.3382/PS.0730991

Paramithiotis, E., & Ratcliffe, M. J. H. (1993). Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood. European Journal of Immunology, 23(1), 96–102. https://doi.org/10.1002/EJI.1830230116

Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lievre, F., & Buck, C. A. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. Development, 100(2), 339–349. https://doi.org/10.1242/DEV.100.2.339

Pardanaud, L., & Eichmann, A. (2011). Extraembryonic Origin of Circulating Endothelial Cells. PLOS ONE, 6(10), e25889. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0025889

Pedersen, A. E., Schmidt, E. G. W., Sørensen, J. F., Faber, C., Nielsen, B. S., Holmstrøm, K., Omland, S. H., Tougaard, P., Skov, S., & Bang, B. (2015). Secretion, blood levels and cutaneous expression of TL1A in psoriasis patients. APMIS, 123(7), 547–555. https://doi.org/10.1111/APM.12385

Pink, J. R., Vainio, O., & Rünbeek, A. -M. (1985). Clones of B lymphocytes in individual follicles of the bursa of Fabricius. European Journal of Immunology, 15(1), 83–87. https://doi.org/10.1002/EJI.1830150116

Plett, P., Frankovitz, S. M., Wolber, F. M., Abonour, R., & Orschell-Traycoff, C. M. (2002). Treatment of circulating CD34+ cells with SDF-1α or anti-CXCR4 antibody enhances migration and NOD/SCID repopulating potential. Experimental Hematology, 30(9), 1061–1069. https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00880-9

Pouget, C., Gautier, R., Teillet, M. A., & Jaffredo, T. (2006). Somite-derived cells replace ventral aortic hemangioblasts and provide aortic smooth muscle cells of the trunk. Development, 133(6), 1013–1022. https://doi.org/10.1242/DEV.02269

Qing, M., Jones, D., & Springer, T. A. (1999). The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. Immunity, 10(4), 463–471. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80046-1

Quesada, J., & Agulleiro, B. (1984). Ultrastructure of granulopoiesis in tunica propria of the bursa of fabricius. Developmental & Comparative Immunology, 8(1), 219–224. https://doi.org/10.1016/0145-305X(84)90027-2

Ratajczak, M. Z., Majka, M., Kucia, M., Drukala, J., Pietrzkowski, Z., Peiper, S., & Janowska-Wieczorek, A. (2003). Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. Stem Cells (Dayton, Ohio), 21(3), 363–371. https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.21-3-363

Ratcliffe, M. J. H. (2006). Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. Developmental & Comparative Immunology, 30(1–2), 101–118. https://doi.org/10.1016/J.DCI.2005.06.018

Ratcliffe, M. J. H. & Härtle, S. (2014). B Cells, the Bursa of Fabricius and the Generation of Antibody Repertoires. Avian Immunology: Second Edition, San Diego, USA: Academic Press 2014, 65–89. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396965-1.00004-2.

Read, L. R., Cumberbatch, J. A., Buhr, M. M., Bendall, A. J., & Sharif, S. (2005). Cloning and characterization of chicken stromal cell derived factor-1. Developmental & Comparative Immunology, 29(2), 143–152. https://doi.org/10.1016/J.DCI.2004.06.010

Reynaud, C. A., Anquez, V., Dahan, A., & Weill, J. C. (1985). A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. Cell, 40(2), 283–291. https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90142-4

Reynaud, C. A., Anquez, V., Grimal, H., & Weill, J. C. (1987). A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. Cell, 48(3), 379–388. https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90189-9

Reynaud, C. A., Imhof, B. A., Anquez, V., & Weill, J. C. (1992). Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo. The EMBO Journal, 11(12), 4349–4358. https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05534.X

Reynaud, C. A., Mackay, C. R., Müller, R. G., & 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. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90323-Q

Richard, C., Drevon, C., Canto, P. Y., Villain, G., Bollérot, K., Lempereur, A., Teillet, M. A., Vincent, C., Rosselló Castillo, C., Torres, M., Piwarzyk, E., Speck, N. A., Souyri, M., & Jaffredo, T. (2013). Endothelio-Mesenchymal Interaction Controls runx1 Expression and Modulates the notch Pathway to Initiate Aortic Hematopoiesis. Developmental Cell, 24(6), 600–611. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.02.011

Romano, N., Baldassini, M. R., Abelli, L., Aita, M., & Mastrolia, L. (1996). Ultrastructural study on the plical epithelium of the bursa of Fabricius in chick embryos: influence of partial decerebration and hypophyseal allografts. Journal of Anatomy, 188(Pt 1), 29. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8655413/

Rosenkilde, M. M., Gerlach, L.-O., Jakobsen, J. S., Skerlj, R. T., Bridger, G. J., & Schwartz, T. W. (2004). Molecular Mechanism of AMD3100 Antagonism in the CXCR4 Receptor. Journal of Biological Chemistry, 279(4), 3033–3041. https://doi.org/10.1074/jbc.m309546200

Sahoo, N. C., Rao, K. V. S., & Natarajan, K. (2002). CD80 Expression is Induced on Activated B Cells Following Stimulation by CD86. Scandinavian Journal of Immunology, 55(6), 577–584. https://doi.org/10.1046/J.1365-3083.2002.01093.X

Sayegh, C. E., Demaries, S. L., Iacampo, S., & Ratcliffe, M. J. H. (1999). Development of B cells expressing surface immunoglobulin molecules that lack V(D)J-encoded determinants in the avian embryo bursa of Fabricius. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(19), 10806. https://doi.org/10.1073/PNAS.96.19.10806

Sayegh, C. E., Demaries, S. L., Pike, K. A., Friedman, J. E., & Ratcliffe, M. J. H. (2000). The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development. Immunological Reviews, 175(1), 187–200. https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2000.IMR017507.X

Säynäjäkangas, R., Uchida, T., & Vainio, O. (2009). Differential Gene Expression in CD45+ Cells at Para-aortic Foci Stage of Chicken Haematopoiesis. Scandinavian Journal of Immunology, 70(3), 288–294. https://doi.org/10.1111/J.1365-3083.2009.02304.X

Schneider, K., Kothlow, S., Schneider, P., Tardivel, A., Göbel, T., Kaspers, B., & Staeheli, P. (2004). Chicken BAFF—a highly conserved cytokine that mediates B cell survival. International Immunology, 16(1), 139–148. https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXH015

Schusser, B., Collarini, E. J., Pedersen, D., Yi, H., Ching, K., Izquierdo, S., Thoma, T., Lettmann, S., Kaspers, B., Etches, R. J., van de Lavoir, M. C., Harriman, W., & Leighton, P. A. (2016). Expression of heavy chain-only antibodies can support B-cell development in light chain knockout chickens. European Journal of Immunology, 46(9), 2137–2148. https://doi.org/10.1002/EJI.201546171

Schusser, B., Collarini, E. J., Yi, H., Izquierdo, S. M., Fesler, J., Pedersen, D., Klasing, K. C., Kaspers, B., Harriman, W. D., van de Lavoir, M. C., Etches, R. J., & Leighton, P. A. (2013). Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(50), 20170–20175. https://doi.org/10.1073/PNAS.1317106110

Seco, P., Martins, G. G., Jacinto, A., & Tavares, A. T. (2020). A Bird's Eye View on the Origin of Aortic Hemogenic Endothelial Cells. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8, 1376. https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.605274

Sheng, G. (2010). Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view. The International Journal of Developmental Biology, 54(6–7), 1033–1043. https://doi.org/10.1387/IJDB.103105GS

Spertini, O., Luscinskas, F. W., Kansas, G. S., Munro, J. M., Griffin, J. D., Gimbrone, M. a, & Tedder, T. F. (1991). Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 147(8), 2565–2573. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1717567/

Staines, K., Young, J. R., & Butter, C. (2013). Expression of chicken DEC205 reflects the unique structure and function of the avian immune system. PloS One, 8(1). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0051799

Taira, E., Takaha, N., Taniura, H., Kim, C. H., & Miki, N. (1994). Molecular cloning and functional expression of gicerin, a novel cell adhesion molecule that binds to neurite outgrowth factor. Neuron, 12(4), 861–872. https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90338-7

Thomas, J. L., Pourquie, O., Coltey, M., Vaigot, P., & le Douarin, N. M. (1993). Identification in the Chicken of GRL1 and GRL2: Two Granule Proteins Expressed on the Surface of Activated Leukocytes. Experimental Cell Research, 204(1), 156–166. https://doi.org/10.1006/EXCR.1993.1020

Thompson, C. B. (1992). Creation of immunoglobulin diversity by intrachromosomal gene conversion. Trends in Genetics, 8(12), 416–422. https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90324-W

Toivanen, P., & Toivanen, A. (1973). Bursal and postbursal stem cells in chicken. functional characteristics. European Journal of Immunology, 3(9), 585–595. https://doi.org/10.1002/EJI.1830030912

Toivanen, P., Toivanen, A., & Good, R. A. (1972). ONTOGENY OF BURSAL FUNCTION IN CHICKEN I. Embryonic Stem Cell for Humoral Immunity 1. J. Immunol 109(5), 1058-1070. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.109.5.1058

Toivanen, P., Toivanen, A., & Tamminen, P. (1974). Bursal and postbursal cells in chicken. Occurrence of postbursal cells in bone marrow, thymus and spleen. European Journal of Immunology, 4(6), 405–410. https://doi.org/10.1002/EJI.1830040604

Vainio, O., Dunon, D., Aïssi, F., Dangy, J. P., McNagny, K. M., & Imhof, B. A. (1996). HEMCAM, an adhesion molecule expressed by c-kit+ hemopoietic progenitors. Journal of Cell Biology, 135(6), 1655–1668. https://doi.org/10.1083/JCB.135.6.1655

Varki, A. (1994). Selectin ligands. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(16), 7390–7397. https://doi.org/10.1073/PNAS.91.16.7390

Viertlboeck, B. C., & Göbel, T. W. (2007). Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. Veterinary Immunology and Immunopathology, 119(1–2), 137–141. https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2007.06.017

WARNER, N. L., SZENBERG, A., & BURNET, F. M. (1962). THE IMMUNOLOGICAL ROLE OF DIFFERENT LYMPHOID ORGANS IN THE CHICKEN. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science, 40(5), 373–388. https://doi.org/10.1038/ICB.1962.42

Weinstein, P. D., Mage, R. G., & Anderson, A. O. (1994). The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit. Advances in Experimental Medicine and Biology, *355*, 249–253. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2492-2_42

Withers, D. R., Davison, T. F., & Young, J. R. (2006). Diversified bursal medullary B cells survive and expand independently after depletion following neonatal infectious bursal disease virus infection. Immunology, 117(4), 558–565. https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2006.02332.X

Wu, Y., & Hirschi, K. K. (2021). Tissue-Resident Macrophage Development and Function. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8, 1750. https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.617879

Xiao Ling, K., Peng, L., Feng, Z. J., Wei, C., Yan, Y. W., Nan, S., Qi, G. C., & Wei, W. Z. (2016). Stromal Derived Factor-1/CXCR4 Axis Involved in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Recruitment to Injured Liver. Stem Cells International, 2016. https://doi.org/10.1155/2016/8906945

Xu, W. D., Li, R., & Huang, A. F. (2022). Role of TL1A in Inflammatory Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. Frontiers in Immunology, 13, 2573. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.891328

Yvernogeau, L., Gautier, R., Petit, L., Khoury, H., Relaix, F., Ribes, V., Sang, H., Charbord, P., Souyri, M., Robin, C., & Jaffredo, T. (2019). In vivo generation of haematopoietic stem/progenitor cells from bone marrow-derived haemogenic

endothelium. Nature Cell Biology, 21(11), 1334–1345. https://doi.org/10.1038/S41556-019-0410-6

Yvernogeau, L., Nagy, N., Dunon, D., Robin, C., & Jaffredo, T. (2022). Development of the avian hematopoietic and immune systems. Avian Immunology, Third Edition, San Diego, USA: Academic Press 2022, 45–69. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818708-1.00031-2

Zhao, S., Feng, S., Tian, Y., & Wen, Z. (2022). Hemogenic and aortic endothelium arise from a common hemogenic angioblast precursor and are specified by the Etv2 dosage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 119(13), e2119051119. https://doi.org/10.1073/PNAS.2119051119

Zhao, X. W., van Beek, E. M., Schornagel, K., van der Maaden, H., van Houdt, M., Otten, M. A., Finetti, P., van Egmond, M., Matozaki, T., Kraal, G., Birnbaum, D., van Elsas, A., Kuijpers, T. W., Bertucci, F., & van den Berg, T. K. (2011). CD47-signal regulatory protein-α (SIRPα) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(45), 18342–18347. https://doi.org/10.1073/PNAS.1106550108

Zou, Y. R., Kottman, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., & Littman, D. R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. Nature 1998 393:6685, 393(6685), 595–599. https://doi.org/10.1038/31269

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

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

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

11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

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

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

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

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

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Nagy Nándor egyetemi tanárnak, doktori munkám elkészítéséhez nyújtott szakmai és emberi támogatásáért, aki optimizmusával, kifogyhatatlan ötleteivel, időt és energiát nem kímélve segítette és egyengette kutatói pályámat.

Köszönöm Prof. Dr. Alpár Alán intézetigazgatónak, hogy lehetővé tette és támogatta posztgraduális tanulmányaim végzését a Semmelweis Egyetem, Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében. Köszönettel tartozom Dr. Zsiros Viktória adjunktusnak, disszertációm alapos bírálata során megfogalmazott, értékes kritikai megjegyzéseiért és támogató, baráti szavaiért.

Külön köszönettel tartozom Dr. Kocsis Katalin adjunktusnak, aki végtelen türelemmel, sok bátorítással segítette mindennapi munkámat, valamint nagy segítségemre volt a disszertációm szerkesztésénél.

Köszönetet szeretnék mondani jelenlegi PhD-hallgató társaimnak, Halasy Viktóriának, Soós Ádámnak és Szőcs Emőkének, akik nagy segítségemre voltak a kutatási feladatok elvégzésében és disszertációm elkészítésében.

Köszönettel tartozom laboratóriumunk valamennyi jelenlegi és egykori munkatársának Prof. Dr. Oláh Imrének, Dr. Herberth-Minkó Krisztinának, Dr. Bódi Ildikónak, Dr. Dóra Dávidnak, Dr. Molnár Dávidnak, Dr. Barad Csillának, Kovács Tamásnak, Fügedi Jutkának, Fölker Orsolyának, Orbán Editnek, Kovács Adriennek, Orbán Lilinek és Vidra Györgynének, akik végig segítségemre voltak és hozzájárultak céljaim megvalósításához.

Örök hálával tartozom családomnak, mindenekelőtt férjemnek, Pecsenye Péternek, aki végtelen szeretetével, önzetlen áldozathozatalával biztos hátteret nyújtott számomra mindvégig. Külön köszönettel tartozom kislányunknak, Pecsenye Véda Zsófiának, a sok türelemért és ölelésért, amit a disszertáció írása közben tőle kaptam.