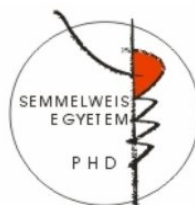


A madár thymus dendritikus sejtjeinek in vivo identifikálása és a thymus velőállományának kompartmentalizációja

Doktori tézisek

Bódi Ildikó

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Oláh Imre, MTA doktora, professor emeritus

Hivatalos bírálók: Dr. Prohászka Zoltán, MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Németh Péter, Ph.D, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Balogh Péter, Ph.D, egyetemi docens
Dr. Székely Andrea, Ph.D, egyetemi docens

Budapest, 2016

1. BEVEZETÉS

A Steinman és Cohn által identifikált és karakterizált egér lép dendritikus sejtek (DC) lymphoid eredetűek, meghatározásuk során a szerzők morfológiai kritériumokra hagyatkoztak (Steinman és Cohn 1973). Közleményükben leírják, hogy e sejtek megkülönböztető jegyeként szolgál a nagy, jellegzetes formájú sejtmag, a hosszú citoplazma nyúlvány, és a számos mitokondrium. Később bizonyították, hogy a DC-ek nem fagocitálnak és Ia (MHCII) antigént expresszálnak (Steinman és mtsai 1979).

A DC-ek alapvető szerepet töltenek be mind a primer, mind pedig a sekunder nyirokszervekben. A központi nyirokszervekben a T- és B-sejtek érésében, valamint szelekciójában vesznek részt, azonban a perifériás nyirokszervekben (lép, nyirokcsomó, bélhez,- tüdőhöz,- valamint a bőrhöz asszociált nyirokszövet) való lokalizációjuk követi a T- és B-sejtek elhelyezkedését. Az interdigitáló dendritikus sejtek (IDC) a T-dependens területeken, míg a folliculáris dendritikus sejtek (FDC) a nyirokszevek B-sejtek által benépesített területein helyezkednek el. Az IDC-ek feladata az antigénprezentációban rejlik a T-sejtek számára, míg a FDC-ek az immunkomplexek megkötése által stimulálják a B-sejteket. A lymphoid DC-ek expresszálják a CD45 pán leukocytá markert, ami hemopoetikus eredetükre utal.

A madarak DC-jeinek felfedezése White és mtsai (1963) nevéhez fűződik. Csirkéket injektáltak humán szérum albuminnal (HSA) intravénásan. Az injektálást követően HSA-t detektáltak a lép fehér pulpájában lévő ecsetkapillárisok körüli sejtekben, majd néhány nappal később az antigént (HSA) hordozó sejteket a csíracentrumokban lehetett

kimutatni (White és mtsai 1969). Az antigénprezentációért felelős sejteket DC-eknek nevezték el, habár a “makrofágok egy típusának” tekintették. Máig is sokan úgy gondolják, hogy e sejtek fejlődési útvonala, differenciálódása és funkciója teljes mértékben eltér a makrofágok populációjától, ugyanakkor számos bizonyíték alátámasztja, hogy a DC-ek és a makrofágok egy közös progenitorból differenciálódnak.

A Steinman és Cohn nevéhez fűződő DC-ek felfedezése után néhány évvel *in vivo* körülmények között identifikálták a madár FDC-jeit (Oláh és Glick 1979), valamint a bursai szekrécios dendritikus sejteket (BSDC) is (Oláh és Glick 1978). Az elmúlt 40 évben laboratóriumunkban a madár primer és secunder nyirokszervek DC-jeinek további azonosítása, valamint karakterizálása volt irányadó.

A madár DC-eket fény- és elektronmikroszkópos szinten is identifikálták, további jellemzésüket a különböző csirkespecifikus monoklonális antitestek használata, valamint a csirke-fürj kiméra technika alkalmazása tette lehetővé.

A madár thymus dendritikus sejtjeiről (TDC) egészen máig csak *in vitro* adat áll rendelkezésünkre. 1984-ben Oliver és Le Douarin csirke és fürj thymusból olyan sejteket izoláltak, melyeket *in vitro* körülmények között tartva nyúlványos, nem fagocitáló, Ia^+ (MHCII⁺) sejtekként írtak le, és ezeket a sejteket tekintették a DC-ek megfelelőinek. Mindemellett, *in vivo* semmilyen adat nem áll rendelkezésünkre a csirke TDC-ekről, ezért munkám legfőbb célja a TDC-ek *in vivo* meghatározása volt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A madarak perifériás nyirokszerveiben (lép, cecalis,- pyloricus és esophagealis tonsilla) valamint a tobozmirigyben lévő DC-eket már jórészt azonosították és karakterizálták, azonban a centrális nyirokszervek közül csak a bursa szekréción dendritikus sejtjeit ismerjük (Oláh és Glick,1978). Tekintettel arra, hogy a madár TDC-ekről in vivo nem rendelkezünk információval, ezért elsődleges célunk volt:

1. A madár thymus dendritikus sejtjeinek in vivo cytológiai (elektronmikroszkópos szintű) identifikálása és immunmorfológiai karakterizálása.

A thymus velőállományban lévő hámsejtek a dendritikus sejtekkel együtt felelősek a centrális tolerancia kialakításáért, azaz a thymus negatív szelekciójáért, ezért:

- 2. Célunk volt a TDC-ek hámhoz való viszonyának meghatározása.**
- 3. További célul tűztük ki, morfometriás méréssel meghatározni a velőállomány további kompartmentjeinek: a keratin negatív területek (KNA) és a keratin pozitív hálózat (KPN) térfogati eloszlását.**
- 4. Jellemezni kívántuk a KNA sejtes összetételét, valamint**
- 5. célunk volt a KNA eredetének meghatározása.**

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez csirke (*Gallus gallus*, White Leghorn SPF, Phylaxia-Sanophi, Magyarország) és fűj (*Coturnix coturnix japonica*) embriókból (3, 6, 11, 13, 17, 20 napos), valamint kikelt állatokból (4-8 hetes), illetve 8 hetes gyöngytyúkból (*Numida meleagris*) és nyúlból nyert szerveket használtunk. A tojásokat laboratóriumunk keltetőgépeiben forgatórácson inkubáltuk 38°C hőmérsékleten, 60%-os páratartalom mellett. Valamennyi kísérlethez csoportonként legalább négy állat mintáit használtuk fel. Az állatkísérletek a Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács jóváhagyásával történtek (az engedély iktatószáma: 22.1/10032-4/2010).

3.2. Immunhisztokémia

A TDC-ek fenotípusának morfológiai jellemzésére használt antitestek kimutatásához egyszeres immuncytokémiai, és kettős immunfluoreszcens festést használtunk.

3.3. Félvékony technika, elektronmikroszkópia

A sejtek finomszerkezetének vizsgálatához a 4%-os glutáraldehidben fixált szervekből készített 1,5 μ m-es metszeteket 1%-os toluidinkékkel festettük. Az ultravékony metszeteket uranil-acetáttal és ólom citráttal kontrasztoltuk.

3.4. Pre-embedding immunhisztokémia

A TDC-ek kimutatására 50µm-es metszeteken pre-embedding immunhisztokémia technikát használtunk, melynek során a 74.3 pozitivitást 3,3'-diamino-benzidinnel tettük láthatóvá.

3.5. Dexametazon kezelés

A thymus acut involúciójának, illetve a KPN és a KNA térfogat-eloszlási változásának előidézéséhez 24db 6 hetes csirkét kezeltünk dexametazonnal (DM) hat kísérlet sorozatban. Az állatokat intraperitoneálisan oltottuk 5mg DM-nal testsúly- kilogrammonként 2x5 napon keresztül.

3.6. Proliferáció vizsgálata bromo-deoxyuridinnel

A DM kezelést követő 3. napon az állatokat egyszeri alkalommal bromo-deoxyuridinnel (BrdU) (100 mg/kg testsúlykilogramm) oltottuk be intraperitoneálisan. A BrdU beépülését anti-BrdU antitesttel tettük láthatóvá.

3.7. Morfometriás mérés

A thymus kéreg- és velőállományának, illetve a KPN és a KNA egymáshoz viszonyított térfogati eloszlásának vizsgálatára a Cavalieri sztereológiai mérési módszert használtuk. 3-3 db kontroll és DM-nal kezelt csirke thymusok minden 25. metszetén cytokeratin festést végeztünk. Meghatároztuk a csirke thymus kéreg- és velőállományának, valamint a velőállomány keratin pozitív (KPN) és keratin negatív területeinek (KNA) térfogatát kontroll és DM kezelt állatokban.

3.8. Fűrj-csirke és csirke-fűrj testüreg kiméra

A 74.3 pozitív TDC-ek eredetének vizsgálatára 3 napos embrionális fűrj, szén szemcsével megjelölt 3-4. garattasakot ültettünk át 3 napos csirke embrió testüregébe (fűrj-csirke kiméra). Ezt követően a tojásokat ragasztószalaggal zártuk le, majd további 2 hétig inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a 17 napos embriók hasüregét felnyitottuk, a graftokat eltávolítottuk, majd szövettani és immuncytokémiai elemzést végeztünk rajtuk. Csirke-fűrj kiméra esetében 3 napos embrionális csirke 3-4. garattasakot ültettünk át 3 napos fűrj embrió testüregébe.

3.9. Fűrj-csirke chorioallantois membrán kiméra

A TDC-ek hovatarozásának további kimutatására 3 napos fűrj embrióból származó 3-4. garattasakot a 9 napos csirke embrió chorioallantois membránjára (CAM) ültettük.

3.10. Ezüst impregnáció

Feltételeztük, hogy a thymus KNA-ének alapszöveve retikuláris kötőszövet, ezért ennek bizonyítására Gömöri-féle ezüst impregnációt végeztünk (Krutsay 1980).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A csirke thymus dendritikus sejtjeinek nyomában

A 74.3 antitest egy olyan csirke specifikus monoklonális ellenanyag, ami a Bursa Fabricii-ben a BSDC-eket, a lépben az IDC-eket, míg a cecalis tonsilla csíracentrumaiban a FDC-eket jelöli, ezért vizsgálataimban a thymus dendritikus sejtjeinek (TDC) felderítésére alkalmaztam.

A 74.3 antitest a csirke thymus kéreg-velő határán és a velőállományban egyedi sejteket és sejtszöveteket fest. A kéregállományban különálló 74.3 pozitív sejtek láthatóak. A kéreg-velő határon csoportokba tömörülő 74.3 pozitív sejtek MHCII és vimentin pozitívak. Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a csoportokba tömörülő sejtek, valamint a kéregállományban lévő egyedi sejtek különböző sejtpopulációhoz tartoznak-e, a csirke specifikus CD83 és DEC205 emlős DC homológ markereket használtam. A kéreg-velő határon és a velőállományban lévő 74.3⁺ sejtszövetek CD83 és CD45 pozitivitást is mutattak. A 74.3⁺CD83⁺ kettősen pozitív sejtek nem mutattak DEC205 pozitivitást, bár a kéregállományban elszórt, egyedi DEC205⁺ sejteket találtunk, melyek nem expresszálják a CD45 hemopetikus markert.

Elektronmikroszkópos vizsgálataink során olyan nyúlványokkal rendelkező sejteket találtunk, melyekben kimutathatóak a lamelláris elrendeződésű granulomok. A sejtmagok alakja (maghártya invagináció), heterokromatin szerkezete, valamint a sejtmag egyik oldalán lokalizálódó granulomok, melyek esetenként lamelláris belső szerkezetet mutatnak, excentrikus jelleget kölcsönöz a sejtnak. A morfológiai és

immuncytokémiai jegyekre hagyatkozva ezeket a sejteket a thymus dendritikus sejtjeinek (TDC) tartjuk. Az elektronmikroszkópos felvételek szerint a TDC-ek gyakran az KNA-ban található erek körül helyezkednek el.

A $DEC205^{+}74.3^{+}MHCII^{+}CD45^{-}$ sejtek cytotokeratin intermedier filamentumot expresszálnak.

A $CD45^{+}74.3^{+}$ kettősen pozitív és a $CD45^{-}74.3^{+}$ egyszeresen pozitív sejtek két különböző populációt alkotnak, melyek eredetének kimutatása érdekében csirke-fürj, illetve fürj-csirke testüreg és chorioallantois membrán (CAM) kiméra kísérleteket végeztünk.

Mind az embrionális festési mintázatok, mind a kiméra kísérletek arra engednek következtetni, hogy a 74.3 monoklonális antitest a thymusban valóban két populációt jelöl. Vagyis a kéregállományban lévő endodermális eredetű $DEC205^{+}74.3^{+}MHCII^{+}CD45^{-}$ kérgi hámsejteket és a $DEC205^{-}74.3^{+}MHCII^{+}CD45^{+}$ hemopoetikus eredetű TDC-eket.

4.2. A madár thymus velőállományának kompartmentalizációja: keratin pozitív hálózat és keratin negatív területek

Hematoxylin-eosin festés alapján a thymus állománya kéreg- és velőállományra tagolható, amit az anti-vimentin festés is megerősít. A cytokeratin festés azonban meglepő képet mutat a velőállományban: cytokeratin pozitív kötegek - melyek összeköttetésben vannak a kéregállomány hámretikulumával – szövik át a velőállományt, keratin pozitív hálózatot (keratin positive network-KPN) képezve, míg a hálózat hézagait keratin negatív területek (keratin negative area-KNA) töltik ki. Ez a két, különböző morfológiai mintázat igényelte, hogy részletesebben megvizsgáljuk a velőállomány szerkezetét.

A thymus egy olyan komplex szerv, melynek alap vázát a 3-4. garattasak endodermájából fejlődött hámretikulum képezi. A tokot és a sövényeket alkotó kötőszövet a cardiális ganglionlécből származik, amit hemopoetikus eredetű sejtek (lymphocyták, makrofágok, dendritikus sejtek) kolonizálnak.

A 3-4. garattasakból fejlődő endodermális eredetű epithelialis köteg a környező mesenchymába nő, melyek kölcsönös interakciója következtében a hámbimbó „sarjadzani” kezd. Az embrionális thymus telep lebenykékre való tagolódásában az úgynevezett primer sövények (PS) fontos szerepet töltenek be. A sarjadzás eredményeként elágazódó hámkötegek jelennek meg, melyeknek az elágazódáshoz közelebbi részéből alakul ki a velőállomány, míg a távolabbi részéből a kéregállomány (a mintázat tehát emlékeztet a mirigyek fejlődésére). Az epitheliális kötegek és a PS-ek folyamatos basalis laminával rendelkeznek, melyek folytonossága a kéreg-velő határhoz érve megszűnik, felszakadozik. Ez

lehet az első morfológiai jele annak, hogy a velőállományban nincs vérthymus barrier.

Immuncytokémiai és hisztokémiai vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a PS-ek a velőállományba érve folyamatosak a KNA-tel. A KNA a PS-ek tágulataként értelmezhető, miszerint a hámtelep egyre mélyebb és mélyebb területeibe való nyomulásával kialakítja a vele (PS-ekkel) összefüggő KNA-t. Ezen összefüggésből következik, hogy a két területet (PS és KNA) ugyanolyan szövetnek kell alkotnia. Ezen hipotézisünket ezüst impregnációval, valamint anti-fibronektin és –tenascin immunfestéssel igazoltuk.

A KNA eredetének további igazolására a ganglionléc eredetű myoid sejtek lokalizációját vizsgáltuk. A thymus velőállományára jellemző sejttípus a myosin és aktin filamentumokat tartalmazó myoid sejt. A KNA területein nagy, széles citoplazmával rendelkező, nyúlványos sejteket találtunk. A myoid sejtek olyan magányos sejtek, mint a simaizom sejtek, azonban harántcsíkolatot mutatnak. A harántcsíkolott izom fejlődhet a somitákból vagy a craniális ganglionlécből is. A myoid sejtek KNA-ban való lokalizációja valamint a PS-ek és a KNA egymáshoz való viszonya (vagyis, hogy a PS-ek a velőállományba érve KNA-té “tágulnak”), közvetett bizonyítékai lehetnek a KNA ganglionléc eredetének.

A velőállományban található vérerek kifejezetten a KNA-ben lokalizálódnak, melyek köré csoportokba rendeződnek a DC-ek, míg a B-sejtek a KPN és a KNA határán, mint egy határoló zóna tagjai felsorakoznak. A CD4⁺ sejtek a KNA-ben akkumulálódnak, míg a CD8⁺ sejtek a KPN-ot foglalják el.

A velőhámsejtek (mTECs) az egységes kérgi hámsejthálózat közvetlen folytatásaként alkotják a velőállomány KPN-át. A KPN felszíni hámsejtjei a cytokeratin mellett a flexibilisebb vimentin intermedier filamentumot is produkálják, amely fejlődéstanilag szélesebb spektrumú sejtekben expresszálódk, mint a keratin. A cytokeratin immunfestés során a KPN sejtjei között Hassall testeket (HB) találtunk, melyek nem expresszálnak vimentin intermedier filamentumot, szemben a KPN felszíni hámsejtjeivel, melyeken keresztül történik a T-sejtek migrálása a KNA-ba, majd onnan a perifériára. Feltehetőleg ezen “széli” sejtek jutottak el a hámsejtek azon differenciálódási szakaszába, ahol, mint funkcióképes, a T-sejtek negatív szeleciójában részt vevő sejtekként működnek. A thymus velőállományának a HB mellett másik érdekes képletei a cysták, melyeket képező hámsejtek is MHCII pozitívak, úgy, mint a thymus vázát alkotó epitheliális retikuláris hámsejtek. Elektronmikroszkóppal a cysta cytoplazmájában myelinszerű granulumokat találtunk, melyek hasonlóságot mutatnak a II. típusú pneumocyták granulumaival. További fénymikroszkópos vizsgálataink alapján kimutattuk, hogy a cystát alkotó sejtek surfactant protein-B-t (SP-B) termelnek, hasonlóan a II. típusú pneumocytákhoz.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

- 1) In vivo azonosítottam a madár (csirke) thymus dendritikus sejtjeit.
- 2) Jellemeztem a TDC-ek cytologiai szerkezetét elektronmikroszkópos szinten.
- 3) A madár thymus velőállományában két élesen elkülönülő részt (keratin pozitív hálózat-KPN és keratin negatív terület-KNA) mutattam ki.
- 4) Kimutattam, hogy a TDC-ek a KNA-ban található erek köré csoportosulnak.
- 5) Kiméra technikával bebizonyítottam, hogy a $74.3^{+}DEC205^{-}CD45^{+}$ csoportokba akkumulálódó sejtek, dendritikus sejtek, valamint a kéregállományban loklizálódó $74.3^{+}DEC205^{+}CD45^{-}$ egyedi sejtek hámsejtek.
- 6) A KPN széli sejtjei vimentin intermedier filamentumot is expresszálnak a cytokeratin mellett, mely a sejtek plaszticitását növeli. Ezek a sejtek érték el a thymus velő hámsejtek végső differenciálódását.
- 7) A cystákat képező hámsejtek a thymus retikuláris hámsejtjeihez hasonlóan MHC II antigént expresszálnak, valamint SP-B-t. Ultrastruktúrájukban is hasonlítanak a II. típusú pneumocytákra, így feltehetőleg képesek lehetnek surfactant termelésre is.
- 8) Eredményeink alapján, arra következtetünk, hogy a vimentin negatív Hassall testek sejtjeinek differenciálódása a thymus fejlődés későbbi szakaszában futott zsákutcába.
- 9) A thymus felszínét és a PS-eket határoló hámsejtek membrana basalis folyamatos, azonban a velőállomány KNA-be érve ez a folyamatosság megszűnik, a membrana basalis felszakadozik. Ez lehet az első hisztológiai jele a vér-thymus barrier hiányának a velőállományban.

- 10) A myoid sejtek jelenléte a KNA-ben – ami a PS-ek tágulataiként értelmezhetőek - közvetett bizonyítéka lehet a KNA ganglionléc eredetének.
- 11) Vizsgálataink szerint a hisztológiailag megjelenő kéreg-velő határnál a felületileg jelentősebb KPN-KNA határ funkcionálisan fontosabb lehet a KNA felépítése alapján, ami, mint perifériás nyirokszövet fogható fel a thymuson belül.

6. PUBLIKÁCIÓS LISTA

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Nagy N, **Bódi I**, Oláh I (2016) Avian dendritic cells: phenotype and ontogeny in lymphoid organs. Dev Comp Immunol 58:47-59. **IF: 2, 815**

Bódi I, Minkó K, Molnár D, Nagy N, Oláh I (2015) A novel aspect of the structure of the avian thymic medulla. Cell Tissue Res 359:489-501. **IF: 3,565**

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. Br Poult Sci 53:397-400. **IF: 1,005**

A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

N. Nuthalapati, N. Alugubelly, B. Felfoldi, **I. Bódi**, N. Fejszak, G.T. Pharr and I. Olah (2015) Monoclonal Antibody EIV-E12 Recognizes a Glycoprotein Antigen, Which Differs from the B-Cell-Specific chB6 (Bu-1) Antigen. Int J Poult Sci 4 (8): 479-484.

Bódi I, Nagy N, Sinka L, Igyártó BZ, Oláh I (2009) Novel monoclonal antibodies recognise guinea fowl thrombocytes. Acta Vet Hung 57:239-246. **IF: 0,624**