

Zárójelentés

Lymphomyeloid és hemopoietikus szervek fejlődésbiológiája: embryomanipuláció című OTKA pályázatról; 2003-2006.

Témavezető: Dr. Oláh Imre

Általános, a téma kidolgozását érintő információk

A pályázatban a témavezetőn kívül három PhD-vel rendelkező (Nagy Nándor, Kocsis Katalin, Magyar Attila) és négy PhD-hallgató (Igyártó Botond, Minkó Krisztina, Felföldi Balázs, Biró Éva) vett részt. A négy PhD-hallgató közül mára kettőnek megvan a PhD fokozata, egy az USA-ba távozott 2004 elején és egy pedig előreláthatólag 2008-ban védeni fog; a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolája által megszabott összimpactfaktor számát már teljesítette.

Az OTKA programban meghatározott céltól eltérően, de a fejlődésbiológiához kapcsolódva egy ötödik PhD hallgató munkáját is támogattam OTKA pályázati pénzből – a pályázat egészéhez viszonyítva jelentéktelen összeggel – ezért nem éreztem, és ma sem érzem, hogy ez jelentésköteles lett volna. Az általa írt négy impactfaktoros munkából kettőben az OTKA pályázat támogatását megjelöltük. Ezt a két munkát itt sorolom fel, nem a közlemények között:

Tóth, M., Alpar, A., Patonay, L., Olah, I. (2006). Development and surgical anatomy of the round window niche. Ann. Anat. 188:93-101.

Tóth, M., Moser, G., Patonay, L., Olah, I. (2006). Development of the anterior chordal canal. Ann. Anat. 188:7-11.

Bár a pályázatban megjelölt cél elérését folyamatosan igyekeztünk teljesíteni, de néhány lassító tényezőről be kell számoljak: Dr. Nagy Nándor 2004 szeptemberétől 2006 szeptemberéig a Harvardon dolgozott. Ez alatt a bélentoderma fejlődését vizsgálta, melyről négy dolgozata jelent meg, ezeket is itt sorolom fel, mert nem a laborban és nem OTKA támogatással készültek. A jelentés leíró részében sem szerepelnek.

Nagy, N., Brewer, K.C., Mwiszerwa, O., Goldstein, A.M. Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. Dev Dyn. 2007 Jan;236(1):73-83.

Nagy, N., Goldstein, A.M. Intestinal coelomic transplants: a novel method for studying enteric nervous system development. Cell Tissue Res. 2006 Oct;326(1):43-55.

Nagy, N., Goldstein, A.M. Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. Dev Biol. 2006 May 1;293(1):203-17.

Goldstein, A.M., Brewer, K.C., Doyle, A.M., Nagy, N., Roberts, D.J. BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. Mech Dev. 2005 Jun;122(6):821-33.

Minkó Krisztina egyéni PhD hallgatóként kezdett a vérképző őssejtek fejlődésével foglalkozni. 2003 végén Le Douarin és Dieterlein-Livre által vezetett munkacsoporthoz csatlakozott két évig, majd szülési szabadságra ment (ma is gyeden van). 2005-ben megvédte PhD értekezését magyar-francia kettős képzésben. Munkájának túlnyomó része már Franciaországban készült OTKA támogatás nélkül, ezért az ő munkáját sem sorolom fel a közlemények között.

Minko, K., Bollerot, K., Drevon, C., Hallais, M.F., Jaffredo, T. From mesoderm to blood islands: patterns of key molecules during yolk sac erythropoiesis. Gene Expr Patterns. 2003 Jun;3(3):261-72.

Kocsis Katalin 2003 augusztusától 2006 őszéig volt szülési szabadságon, így a csoport szinte végig „félgőzzel” működött.

Itt kell megemlítenem, hogy 2005-ben a témavezető Lonnecke Verveldével együtt felkérést kapott - 2007-ben megjelenő - „Avian Immunology” című könyvben a morfológiai fejezet megírására. A fejezet elkészült és 2006-ban az Elsevier-rel kötött szerződés alapján a könyv szerkesztőjének a kéziratot leadtuk, melyet közlésre elfogadtak. A közlemények között könyvfejezetként van felsorolva.

Tárgyi, szakmai összefoglaló

A pályázat a lymphoepithelialis szervek, mint primer nyirokszervek, elsősorban a bursa Fabricii telepének eredetére, a bursa folliculusok kialakulásának indukálására, és ezen belül a dendritikus sejtek szerepére koncentrált. A bursa Fabriciiban a bursai szekréción dendritikus sejtek (BSDC) epithelialis mikro környezetben helyezkednek el, a bőr Langerhans-sejtjeihez hasonlóan. Ezért, és mivel a madarak Langerhans-sejtjeiről szerzett ismereteink meglehetősen hézagosak, a dendritikus sejteknek ezt a szubpopulációját is vizsgáltuk.

A perifériás nyirokszervek közül a lép és a csíracentrum képződése jelentette a fő kutatási területet, valamint a bursa mellett a bélhez asszociált lymphatikus szövet (GALT). A madarakban az emlősökre jellemző nyirokcsomók hiányoznak és ezzel együtt a nyirokkeringésük is kevésbé fejlett, ezért feltételeztük, hogy nem az ektoderma, hanem az entoderma felől jövő antigén információ az elsődleges.

Ma általánosan elfogadott, hogy a bursa Fabricii hám telepe a cloaca (entoderma) diverticulumaként fejlődik. Azonban a korai embrióban a bursa ürege nem a cloaca üregével, hanem az ektoderma analis invaginációjával van közvetlen összefüggésben, ezért feltételezhető,

hogy a bursa hám nem entodermális, hanem ektodermális eredetű. Ennek igazolására in vitro szervtenyészetben, majd in vivo csirke-fürj kiméra készítéssel, bursai mesenchymát együtt tenyésztettünk vastagbél entodermával, illetve farokbimbó ekto- és entodermával. A bursai mesenchyma csak az ektoderma hámból volt képes folliculus indukcióra, míg a cloacalisból nem kaptunk folliculus képződést (**Absztrakt**). Ez ma még megerősítésre vár. Vajon hogyan viselkedik nem farokbimbó ektoderma bursai mesodermával együtt tenyésztve?

1986-ban közöltük, hogy (antitestek hiányában) a BSDC a bursa mesenchymális sejtjeiből differenciálódik, mivel átmeneti alakok a mesenchymális sejtek és a BSDC között kimutathatók félvékony (1 μm vastag) metszeteken. Ezt a feltételezést ma csirke-fürj kiméra és immuncitokémia együttes alkalmazása után újra kellett gondolnunk, mert ezek a kísérletek azt igazolták, hogy a BSDC-k nem mesenchymális, hanem véreredetűek (**Anatomy and Emryology, 2004**).

A madár immunológia szinte kizárólag csirke immunológiának tekinthető. A fejlődésbiológiai kutatásokban pedig a csirke-fürj kiméra és parabiosis bevezetése mérföldkőnek tekinthető, mégsem volt ismeretes a fürj bursa szerkezete és dendritikus sejtjei. NIC2, saját laboratóriumunkban gyöngytyúk bursa sejtek ellen készült monoklonális antitest – keresztreagál fürj sejtekkel is. A NIC2 a gyöngytyúk BSDC cytoplasmaticus antigénjét ismeri föl, így lehetőséget adott arra, hogy a fürj BSDC-jét is identifikáljuk. Az immuncitokémiai vizsgálatok szerint az NIC2 pozitív „anyag” intracitoplazmatikusan jelenik meg, majd szekretálva, solubilis formában is előfordul (**J. Morphology, 2004**). Fürj bursán végzett, később csirkén is ellenőrzött immuncitokémiai munkánk szerint, a csirke és fürj bursában hisztológiailag identifikált macrophagok immuncitokémiával nem igazolhatók; azaz monocyta-macrophag ellenes ellenanyagok bursában negatívak. Ennek a bizarr jelenségnek vagy az a magyarázata, hogy a bursában egészen különös macrophag szubpopuláció van, mely a ma elérhető markerekkel nem identifikálható, vagy a hisztológiailag macrophagnak ítélt sejtek nem „valódi” macrophagok. A folliculushoz-asszociált hámban (FAE) hisztológiailag macrophagok mindig találhatóak, de limfociták nem. A BSDC képes belépni a FAE-ba – valószínűleg turnoverük folytán. Ezért feltételezzük, hogy a bursa folliculus velőállományában lévő „macrophagok” előregedett BSDC-k, azaz nem monocita eredetűek (**J. Morphology, 2004**). Ez a macrophag képződés újabb lehetőségét veti fel.

17 napos embrióban a szikhólyag kivezetőcsövének in ovo lekötése átmenetileg drasztikusan visszavetette a bursa fejlődését; a BSDC-k felszínén és cytoplasmájában IgG és BSDC-marker, 74.3 antigén nem volt detektálható, a B-sejtek száma jelentősen csökkent a folliculusokban. Az adatok azt mutatják, hogy az anyai antigének befolyásolják a bursa késői fejlődését (**Immunology, 2005**).

A csirkék perifériás nyirokszervei a lép és a GALT, valamint a Harder-mirigy. A madarakban a lép jól fejlett, fehérpulpájának központi elemei az ellipszoid vagy Schweigger-Seidel hüvely, a periarteriális lymphocita hüvely (PALS) és a csíracentrum (GC).

Tankönyvi adat, hogy az ellipszoid emlősben koncentrikus szerkezetű, melyben a retikulumsejt eredetű ellipszoid sejtek (EC) macrophagokkal (Ma) váltakoznak. A madár ellipszoid is kétféle sejtből áll: EC és ellipszoidális asszociált sejtéből (EAC), mely fagocita képességű. Csirkefűrj lépkimérés és immuncitokémiás vizsgálatok kimutatták, hogy az ellipszoid mindkét sejtpopulációja hemopoietikus eredetű. A tankönyvi adatokkal ellentétben az EC tehát nem módosult retikulum sejt, hanem véreredetű hemopoietikus sejt (**Developmental Dynamics, 2005**). Ezeknek a vizsgálatoknak szinte mellékleteként – de semmiképpen sem előre tervezett módon – adódott a lép egyes kompartmentjeiben az extracelluláris mátrix megismerésének szükségessége. Legérdekesebb eredménye volt, hogy az ellipszoid körül is van egy discontinuus, basalis membránhoz hasonló szerkezetű, de kémiailag attól különböző struktúra, mely az ellipszoid „tokjának” tekinthető. Így is neveztük el: „capsule of Schweigger-Seidel sheath” (CSS) (**Cell and Tissue Research, 2003**).

Miután igazolódott, hogy az ellipszoid egésze (EC és EAC) hemopoietikus eredetű, további vizsgálat célja volt az EAC valódi funkciójának megközelítése. Még 1982-ben a témavezető feltételezte, tus és tormaperoxidáz iv. injekciója és morfológiai vizsgálatok alapján – (Amer. J. Anat., 1982), hogy az EAC lenne a prekuzora a PALS illetve a GC területén található interdigitáló és follikuláris dendritikus sejteknek (IDC és FDC). A 25 évvel ezelőtti feltételezés most igazolódott. Csirke EAC ellenes saját készítésű monoklonális ellenanyag (E5G12), egy olyan membrán antigént ismer fel, mely jelen van az EAC-n és az FDC-n is. Pneumococcus tokanyagát, a β -galaktozidázt az EAC-k perceken belül internalizálják és vándorolni kezdenek a PALS és GC felé. A PALS széli részén a kettősen festett (β -galaktozidáz hisztokémia és E5G12 pozitív) EAC B-sejtekkel körülvéve csíracentrumokat képez. A kettősen pozitív EAC belépnek a már perzisztáló GC-be is, igazolva, hogy a csíracentrum nemcsak egyetlen antitest ellen képes antitestet termelni (**Cell and Tissue Research, 2007**). Érdeemes megjegyezni, hogy a β -galaktozidázt semmilyen más phagocita (Kupffer, alveolaris macrophag) nem veszi fel, kizárólag az EAC, aminek jelentősége lehet abban, hogy a lép felelős a pneumococcus antigénre adott immunválaszért. Egy másik megjegyzés is ide kívánkozik; az i.v. adott és EAC által szállított β -galaktozidáz pozitív sejtek soha nem jelentek meg a GALT csíracentrumaiban. A jelenség arra utal, hogy a lép és a GALT csíracentrumait indukáló FDC prekuzorok különböző eredetűek.

Az EAC sejtek eredetének és funkciójának vizsgálata során fölmerült, hogy a vérből kimutathatók-e, azaz a keringésben vannak-e olyan hemopoietikus eredetű sejtek, melyek szöveti

környezetben kollagént képesek termelni. Hiszen az EAC-k ilyen sejtek kell legyenek, mert az ellipszoid ECM-t ők termelik. Emlősben számos adat is megjelent; sebgyógyulás során a fibroblastok főleg vérből kivándorló prekursorokból származnak. Embryo vérből fehérvérsejteket tenyésztve prokollagén pozitív sejtek voltak kimutathatók, és ezek a sejtek a lép ellipszoid képzésben is részt vesznek, azaz stromális (mesenchymális) eredetűnek tartott sejtek, hemopoietikus eredetűek. Ez az első közlemény madárban, amely véreredetű fibrocyták létét és organogenesisben játszott szerepét igazolja (**Developmental Dynamics, 2005**).

A Langerhans-sejtek fenotipizálása révén csirke bőrben három subpopuláció volt elkülöníthető, melyek haptén kezelés hatására mobilizálhatók az epidermisből és megjelennek a bőr alatt elszórtan elhelyezkedő lymphoid sejtekből és haptén pozitív Langerhans-sejtekből álló csomókban. Feltételezzük, hogy ezek a lymphoid sejtekből álló csomók az emlősök nyirokcsomóinak evolúciós „kezdeményei” (**Immunology, 2006**).

Az ektodermával (bőrrel)-asszociálódott lymphoid szövet (SALT) kevésbé fejlett madárban, mint emlősben ezért az entoderma felé fordulva elkezdjük szisztematikusan feltérképezni a csirke gastrointestinális traktusát nyirokszervek szempontjából. Az oesophagus és gyomor határán találtunk klasszikus tonsilla szerkezetre utaló struktúrát, melyet oesophagus tonsilla néven írtunk le (**Poultry Science, 2003**) és később immuncitokémiai karakterizálását is elvégeztük (**Acta Veterinaria Hungarica, 2005**). Hasonló tonsilla található a gyomor és duodenum határán is, mely közlésre elküldve (*J. Anat., Nagy, N., Oláh., I Pyloric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken, Journal of Anatomy, közlésre elküldve, 2007*). Ezen a két helyen emlősben nincs tonsilla legfeljebb egy-egy solitér tüsző. Az oesophagus tonsilla jelentőségét lokalizációja adja, mert a gyomor előtt van, és így a gyomor emésztő hatása még nem érvényesül ellentétben a duodenális tonsillával.

A dendritikus sejtek vírusfertőzésben játszott szerepe gyakorlati jelentőségű probléma. A labor 1999 óta tagja volt egy EU-s COST 839-es programnak: „Immunsuppressive viral disease on poultry”. A BSDC-t a témavezető írta le 1978-ban és az elmúlt években kimutattuk, hogy a vírus első megjelenése a bursában BSDC-hez kötött. Fertőző bursa betegséget okozó vírus hatására a BSDC kivándorolnak a follikulum velőállományából a kéregbe, sőt a bursa lumenébe is, miközben a vírus elpusztítja a sejteket. Az extracelluláris közegbe került vírus a BSDC után a B-sejteket is fertőzi. Ezen eredmények közlése után keresték meg a labort Dániából, hogy heterophil granulocytá (analóg sejt az emlős neutrophil granulocytával) depléciója után rendkívül enyhe a fertőzés lefolyása, nincs mortalitás, ellentétben a normál állatokkal. Kérdés volt, milyen hisztopathológiai és immunológiai elváltozások társulnak a bursában a heterophil depléció mellé, különös tekintettel a BSDC-re. Úgy látszik, hogy a heterophil granulocytáknak a BSDC mellett esszenciális szerepe

lehet a vírusfertőzés klinikai (de nem hisztológiai) tüneteinek megjelenésében (**Avian Pathology, 2006**).