

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Tartalomjegyzék

1. Előszó	2
2. Bevezetés	3
3. Specifikus célkitűzések	5
4. Kísérletes körülmények	6
5. Eredmények	8
6. Diskusszió	18
7. Új eredmények összefoglalása	22
8. A szerző publikációs listája	23

PhD tézisek

AZ EGER LÉP VASCULARIS STRÓMA SOKSZÍNŰSÉGE: FENOTÍPUSOS,
FUNKCIONÁLIS ÉS REJUDÉSTANI JELLEGZETESSÉGEK

Dr. Balázs Mercedesz

Témavezető: Dr. Balogh Péter

Alprogramvezető: Dr. Németh Péter

2003

1. Előszó

A lép kiemelkedő fontosságú hemopoetikus és perifériás nyirokszervünk. Egyedi -és jelenleg helyettesíthetetlennek tűnő- szerepét igazolják azok a tanulmányok, amelyek splenectomizált egerek, valamint (a megfelelő prekursor lymphocyták és akcesszórius sejtek defekciusból adódkan) csecsemők és időskorúak bizonyos baktériumokkal szembeni esendőségét demonstrálják. Az elmúlt évtizedek makroszkópos és hisztológiai leírásai alkalmazásával sejtszövetétele és hemopoetikus kompartmentalizációja kimerítő ismeretekkel szolgál, ugyanakkor a vascularis szerveződését illetően kevés adatra hagyatkoztunk.

Jelen tanulmány célja, hogy betekintést nyújtson a lép vascularis stróma-állományának részletekig terjedő szerkezetébe, a lymphoid kompartmentekkel analóg és az azt kiegészítő heterogenitásának feltárásába három újonnan előállított monoklonális antitest (IBL-7/1, IBL-7/22 és IBL-9/2) szöveti reaktivitásának és az általuk felismert antigének egymáshoz való viszonyának vizsgálatával.

Ezeken túlmenően a tanulmány leírja a vascularis kompartmentek postnatis fejlődéstanai szkevenciáját és aláamasszja a feltételezett fejlődéstanai kapcsolatot az endothelialis és lymphoid sejtvonalak között. A morfológiai heterogenitás mellett funkcionális különbségeket tárunk fel a lép endothel alcsoportjai között. Végül összefoglaljuk törekvéseinket egy xemogén chiméra modell kialakítására, amellyel az endothelialis komponenseken túlmenően a lépbe való bevándorlásához szükséges lymphocytá sejtfejszini antigének feldertését tűznük ki célul.

Ezen új adatokkal hozzájárultunk a lép vascularis elemek fejlődéstanai fejtelmeinek feldertéséhez, leírjuk a vascularis kompartmentek fenotípusos és funkcinális sokoldalúságát, amellyel új perspektívákat nyitunk nem csak a lép anatómiájának részletesebb feltárásában, hanem a vérárammal érkező patogének feldolgozásában, eltávolításában résztvevő komponensek kiegészítésében.

2. Bevezetés

2.1. A lép szöveti szerkezete, sejtis elemek a különböző kompartmentekben

A lép a vérárammal érkező patogének, főként idegen antigének eliminálásában kulcszerepet betöltő perifériás nyirokszerv. A struktúrája ennek a funkciónak az optimális betöltéséhez igazodik. Két fő, funkcinálisan szorosan összekötődő egységre, vörös és fehér pulpara tagolódik. Előbbi, főként vörösvérsejteket, és myeloid elemeket: macrophagocytákat és neutrophil granulocytákat tartalmaz, míg a fehér pulpa lymphocytákból és különféle myeloid szubpopulációkból képez önálló funkcinális egységet. A fehér pulpa struktúra organizáló eleme a centrális arteriola, amely köré csoportosulnak a T-lymphocyták és az ún. lymphoid dendritikus sejtek, közösen alkotván a lép T-sejtis zónáját, a PALS-ot. A vörös és fehér pulpa teoretikus határát egy specializált macrophag sejtpopuláció, a MOMA-1 antigént expresszáló metallophil macrophagok vékony, 2-3 sejtis vastagságú gyűrűszerű rétege képezi, amellyel szoros kapcsolatban van a lymphocyták belépési helyétől szolgáló marginalis sinus. E struktúrák szintén fizikai válaszfóvonalat képeznek a lép funkcinálisan eltérő B-lymphocytá alcsoportjai között: proximálisan található a B-sejt follikulusok, nyugvó, nativ, recirkuláló B-lymphocytákkal, folliculáris dendritikus sejtekkel, néhány macrophaggal és helper T-sejtekkel, míg a sinusól distálisan a marginalis zóna helyezkedik el, nem recirkuláló, marginalis zóna B-sejtekkel, (az ún. természetes memória B-sejtpopuláció), egy másik specializált macrophag alcsoport tagjaival, az ER-TR-9 antigént expresszáló marginalis zóna macrophagokkal és az ún. myeloid dendritikus sejtekkel. A fehér pulpa azon kis részén, ahol a MOMA-1 macrophag réteg folytonossága megszűnik, a fehér és vörös pulpa egy csatornán keresztül érintkezik (bridging channel), amely egy általános 'lymphocytá-transzit'-nak tekinthető, hiszen mind a nyugalmi recirkuláló, mind pedig az antigén által aktivált lymphocyták itt hagyják el a vörös pulpát (lásd következő fejezet).

2.2. *Lymphocytia recirculáció nyugalmi állapotban és antigén aktivációt követően*

A csontvelőből és thymusból érkező, éretl, naiv B- és T-lymphocyták recirkulációjuk során a marginális sinuson keresztül hagyják el a vérpályát és lépnek be a lépbe, ahonnan a különféle lymphocytá alcsoportokra szelektíven ható chemoattractáns hatású cytokinek (továbbiakban chemokinek) irányítják útjukat. Az antigén által aktivált B-sejtek a follikulusból és marginális zónából a gyulladássos és a kompartmentalizációt feléls chemokín egyensúly eltolódása következtében a T- és B-sejt zóna határára vándorolnak, ahol fizikai kontaktusba kerülhetnek T-lymphocytákkal, amely lehetőséget biztosít az esetleges T-sejtes kostimulációra. A plasmablastok ezután az össektótó csatornán keresztül a vörös pulpába migrálnak.

Mind a recirkuláció eredményeképpen kialakuló lymphoid és myelo-erythroid kompartmentalizáció, mind pedig az antigének aktivációját követő migráció kisebb részletektől eltekintve néhány évtizede leírt ismereteken alapul, holott az ezen folyamatokban kulcsszerepet játszó funkcionálisan sokrétű vasculáris endothel komponensek nem, vagy csak részlegesen ismertek.

Eddig nem ismert új reagensek kifejlesztése és azok megfelelő alkalmazása kísérletes állatmodelleken rendkívüli fontossággal bírhat a lép vasculatúra eredetének, morfológiájai és funkcionális vonatkozásainak felderítésében.

3. Célkitűzések

I. Egér lép vasculáris strómakomponenseket felismerő patkány monoklonális antitestek előállításai, jellemzése. A másodlagos nyirokcszövetek vasculáris sajátosságainak leírása.

II. Az egér lép vasculáris kompartmentjei fejlődésének feltárása a születéstől a felnőttkori struktúra kialakulásáig.

III. A lépbe történő lymphocytá migráció vizsgálata: az endothel szerepe ebben a folyamatban, fajok közötti strómalis kompatibilitás lehetőségének feltárása.

4. Kísérletes körülmények

4.1. Monoklonális antitestek előállítása

Előzetesen irradiált BALB/c egeret lymphocytá mentes lépsejtjeivel ismételtan immunizáltunk Wistar patkányokat és lépükből szomatikus sejtüzítőt végeztünk a szokásos hybridoma protokoll szerint. 3x800 hybridoma klónt immunhisztokémiával teszteltük és a jelölés mintázat alapján hátrmat további vizsgálatok céljából szelektáltunk.

4.2. Antitestek

Az egér lymphocytá alcsoportok meghatározását a következő mAb-ekkel végeztük: FITC-jelölt anti-egér CD45 (IBL-5/25), PECy5-anti-B220, PE-jelölt-anti-Mac-1, Ter119, CD43, c-Ha, IgM, IgD, CD3, CD21 és FITC-anti-CD23. A patkány leukocytá alcsoportok azonosításához az alábbi egér mAb-eket használtuk: CD45 (OX1, IgG1), CD4 (W-3/25, IgG1), CD8 (OX8, IgG1), valamint a *k-körményláncot* jelölő OX12 (IgG2a).

4.3. FACS analízis

Az újszülött és felnőtt lép, valamint a nyirokcsomó, thymus, és csontvelőn egyszerűs, valamint négyes jelöléseket végeztünk a szokásos FACS protokoll szerint. Az adatokat FACSCalibur készülékkel, a CellQuest programmal gyűjtöttük, a grafikus interpretáció WinMDI 2.8 szoftverrel történt.

4.4. Immunhisztokémia, kongókális mikroszkópia

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat acetonnal fixált fagyaszott szövetelekből készült metszeteken immunfluoreszcens és enzimatikus előhívással végeztük. *In vivo*

jelöléshez FITC-jelölt IBL-7/1 es IBL-9/2 IgG-t használtunk. 15 perccel az oltás után az egereket perfundáltuk, a lépükből készített metszeteket kongókális mikroszkóppal analizáltuk (BioRad MRC1024). Az analízis során a 3 µm-es szeletekből felvett képek együttes projekciójával rekonstruáltuk a lép térbeli szerkezetét.

4.5. Patkány → egér xenogén chimérák előállítása

BALB/c és SCID recipiensek felnőtt patkány teljes csontvelőjének ill. 14 napos embryonális patkány májsejtjeinek transzplantációjával radiációs chimérákat készítettünk 3 kombinációban: FL → BALB/c, FL → SCID es BM → SCID. 4 héttel a rekonstitúció után 2 hetenként a szemzugszoból vett perifériás vérből FACS analízissel meghatároztuk és egyedenként követjük a chimérizmus fokát.

4.6. A patkány lymphocyták funkcionális vizsgálata. Immunizációs kombinációk

A xenogén mikrokörnyezetben differenciálódott patkány lymphocyták funkcióképességét az FL → BALB/c és az FL → SCID csoportokban tanulmányoztuk. Az FL → BALB/c chimérákat a recipiens BALB/c egér (hisztokompatibilitási antigénjeit tekintve H-2d) antigénjeivel szemben allogén (H-2b) tulajdonságú C57.B1/10 egérből izolált EL-4 sejtvonal sejtjeivel immunizáltuk 3 alkalommal 2 hetenként. Az FL → SCID chimérákat előzetesen paraformaldehidben (1%, PBS-ben) fixált BALB/c egér lépsejtjeivel immunizáltuk. Mindkét csoportban a 3. immunizációt követően az antigén-specifikus patkány immunoglobulinok jelenlétét FACS vizsgálattal mutattuk ki, target sejtként az immunizáláshoz használt EL-4, ill. BALB/c lépsejteket használtuk.

5. Eredmények

5.1. Az IBL-7/1, IBL-7/22 és IBL-9/2 mátek szöveti reaktivitása. Endothelialis heterogenitás az egész lépben

Az előzetes tesztelesek során többféle specifikitást klónokat figyelhetünk meg. Ezek közül további vizsgálatok céljából kiválasztottuk az IBL-7/1, IBL-7/22 és az IBL-9/2-t, amelyek eltérő jelölődést mutatnak a lép vasculatúra különböző komponenseivel szemben.

Az IBL-7/1 mAt intenzíven jelöli a lép vörös pulpa, valamint a fehér pulpát körülvevő, marginális zóna sinusoidális hálózatot; kisebb, a fehér pulpába nyúló konfluens sinusoidális mintázattal tarkítva. A vörös pulpa jelölődés intenzitása gyengébb, mint a marginális sinus, ill. a fehér pulpa jelölődése; sőt a vörös pulpa sinusok két alcsoportra oszthatók az IBL-7/1 intenzitás alapján, IBL-7/1^m és IBL-7/1^o. A thymusban az IBL-7/1 pozitív erek a kéreg és velőállományban egyenlő eloszlást mutatnak. Az antitest a nyirokcsomó metszeten nem mutatott reaktivitást.

Az IBL-7/22 a lépben intenzíven jelöli a capillaris endothelt, a centrális arteriólát, valamint kifejezett reaktivitást mutat a vörös pulpa endothelialis hálózatával szemben. Ezek mellett az antitest finom retikuláris rajzolatot mutat a fehér pulpa T-sejt zónájában. A follikulusok mentesek a IBL-7/22 retikuláris mintázatától. A thymusban a vascularis endothelialis jelölődés mellett a léphez hasonló retikuláris mintázatot figyelhetünk meg. Az IBL-7/22 a nyirokcsomóban a magas endotheliális venulákat intenzíven jelöli, valamint eltérően a két másik kiválasztott klónról, minden általunk vizsgált szerv capillaris hálózatát kimutatni képes.

)

Az IBL-9/2 a három antitest közül a legszelektívebb reaktivitással rendelkezik. Kizárólag a lép vörös pulpájában figyelhetünk meg sinusoidális jelölést, amely azonban az IBL-7/1-gyel összehasonlítva, csak a sejtcsoport egy részét ismeri fel.

A FITC-konjugált IBL-7/1 *in vivo* injektálást követően figyelemmel kell lenni az erős jelölődést mutatott, kirajzolva a fehér és vörös pulpa sinusoidok lumenét. A sinusoidok konvergáló mintázatszerűen rajzolódnak ki a marginális zóna felől a fehér pulpa mélyebb részei felé. A reakció a vörös pulpában jóval gyengébb volt. Az IBL-9/2-vel hasonlóan intenzív lumenális reaktivitást figyelhetünk meg a vörös pulpa sinusoidok egy alcsoportján.

5.2. A lép vasculatúra fejlődése a születéstől a felnőttkori struktúra kialakulásáig

A lép vasculatúra fejlődését immunhisztokémiai vizsgálattal határoztuk meg a születést követő 1 hónapon belül. A panel tartalmazott két lép sinus endothel specifikus (IBL-7/1 és IBL-9/2) és két pan-endothelialis (IBL-7/22 és anti-CD31) antitestet. *Újszülött esetekben* (fiatalabb, mint 12 óra), minden vascularis struktúra komponens jelen van, bár elterjedőbenük jelenősen eléri a felnőttkorban megfigyelhetőket. *Egyhetes* korban a vörös és fehér pulpa szétválásának, valamint a fehér pulpa kompartmentalizációjának kezdetleges jeleit figyelhetjük meg. A marginális sinus formája az egymással kapcsolatban lévő endothel elemek révén azonosíthatóvá vált, amelyeken intenzíven jelölődtek az IBL-7/1 ellenanyagokkal. Meg kell jegyezni azonban, hogy a sinus még nem vált folyamatos struktúrává, ami az IBL-7/1 reaktivitásban látható hiányosságokként észlelhetünk. Az IBL-7/1 pozitív lymphocytá reaktivitás még mindig megfigyelhető. Az IBL-9/2 pozitív sejtek összefüggő, sinusoidális hálózatra emlékeztető rajzolata megkezdődött. *Három hetes* kora kialakult a felnőttre jellemző vascularis struktúra. A marginális sinus közel folyamatos régióként látható, elválasztva a fehér pulpa belső részét a marginális zónától. Ezzel egyidejűleg a fehér pulpa is tökéletesen kompartmentalizálódott T-és B-

zónára. Az IBL-7/1 lymphocytá reaktivitása csak csekély nyomként látható a marginális zónában. Az IBL-9/2 pozitív vörös pulpa sejtek kiterjedt, elágazó hálózatú fejlődtek. E jelekkel írható le a lép felhőtkori vasculáris szerkezete.

5.3. *Feltételezett fejlődéstani kapcsolati a B-lymphoid és az endothelellis sejtvonalak között: a marginális sinus endothel antigen dimenitileg expresszióidit újszülöttkori B lymphocytákon és erythroid sejteken*

Ellentétben a felhőtt lépőből szerzett adatokkal, ahol a lymphocytá populációnak csekély hányadán figyelhetünk meg IBL-7/1 jelölődést (ld. később ebben a fejezetben), az újszülöttkori lépsejtek (FACS analízissel meghatározott lymphoid kapu sejtek) jelentős frakciója IBL-7/1 pozitívnak bizonyult. Az IBL-7/1 antigén megtalálható mind az erythroid, mind B-sejteken, ugyanakkor nem expresszálódnak a T- és monocytá vonal sejtjein. A B-sejteken belül mind a sejtfelszíni IgM-et és IgD-t hordozó sejteken jelen van. A korai B-sejt "erős" markerekkel (C-kit és CD43) azonosított alsoporotonkon megfigyelt expresszióiból arra következtethetünk, hogy az IBL-7/1 antigén valamikor a proVpre B stádium átmenetében jelenik meg újszülöttkorban.

Felhőtkorra a lépsejtek csak elenyésző frakciója őrizte meg az IBL-7/1 reaktivitását (kb. a lymphoid kapu kevesebb, mint 7%), a B-sejtek túlnyomó többsége nem expresszálja az antigént. Az IBL-7/1 antigén megmaradt expressziója korrelálható a B-sejtek sejtfelszíni Ig izotípus minizátaival. Az IBL-7/1 negatív B lymphocyták IgM^b/IgD^{hi} fenotípusúak, míg az IBL-7/1 pozitív B-sejtek az IgM^{hi}/IgD^{lo} csoportba tartoznak. A különféle membrán Ig izotípus expresszió szoros összefüggésben van a B-sejtek lépben törtéző elhelyezkedésével (marginális zóna, ill. folliculus).

Megfigyeléseink szerint az IBL-7/1 antigén felhőtkorban a nem-recirkuláló marginális zóna B-sejteken (CD21^{hi}/CD23^{lo}) található, ugyanakkor a folliculáris B-lymphocyták (CD21^{hi}/CD23^{hi}) nem hordozzák az antigént.

A felhőtt csontvelői erythroid sejtek megőrizték IBL-7/1 reaktivitásukat. Szemben az újszülöttkori primer B-sejt fejlődési alakokon észlelt IBL-7/1 expresszióval, a csontvelői alakok kevesebb, mint 10%-a bizonyult IBL-7/1 pozitívnak.

Összefoglalva a fenotípus elemzés során megfigyeltet, arra következtethetünk, hogy az IBL-7/1 antigén a sinus endothel és erythroid vonalak mellett átmenetileg megjelenik a primer B-sejtérés alakjain újszülött lépben, amely expresszió azonban minimumálisan csökken a csontvelői alakokon.

5.4. *A lépbe törtéző lymphocytá migráció: fizikai kapcsolati a marginális sinus endothel és adaptív sejttranszferrel bejuttatott lépsejtek között*

A vizsgált antitestek közül az IBL-7/1 és az IBL-7/22 *in situ* jelöli a lymphocyták érpályából törtéző kilépési helyeként ismert marginális sinus. A CFSE-jelölt lép eredetű lymphocyták intravénás injektálása után röviddel (15 perc) azt találtuk, hogy a jelölt sejtek többsége az IBL-7/1 pozitív marginális sinus mentén található. Meglepésként észleltük, hogy ebben a korai időpontban a jelölt sejtek csak kisebb frakciója korlátozódott a vörös pulpára, amelyek azonban a 'nem IBL-9/2 pozitív', hanem szintén az IBL-7/1 pozitív endothelialis elemekkel asszociálódtak.

5.5. *A patkány → egér chimérik analízise*

'Lép homing'-gal asszociálható egér lymphocytá specifikus antigének vizsgálataira xenogén hemopoetikus chimérikát állítottunk elő több donor-recipients kombinációban. A donor hemopoetikus szövetből fejlődő lymphocyták és granulocyták (nagy valószínűséggel más hemopoetikus sejtekkel együtt, amelyekre vizsgálataink nem terjedtek ki) a rekonstitúció követő 4 héten belül megjelentek a periferiás vérben.

5.5.1. A chimérisztus fokának meghatározása és nyomkövetése

A palkány hemopoetikus sejtek transzplantációját követő 30. naptól 2 hetenként megvizsgáltuk a donor-recipiens leukocyták arányát, teljes perifériás vérből az egér és palkány specifikus CD45 expresszió alapján. A FITC-IBL-5/25 mAt az egér CD45+ leukocytákat nagy intenzitással, homogenen jelöli. Az OX1 mAt a fizikai paraméterek alapján meghatározott lymphocytá populáción PE-anti-egér-IgG1 másodlagos mAt-tel történő előhívás után heterogén jelölést mutatott. Granulocytákon alacsonyabb denzitással és homogenen expresszálódik a jelöléshez használt mindkét CD45 specifikus antitesttel felismert epitóp.

Az így kapott adatokból a donor és recipiens sejtek mennyiségéből mindenkör kiszámítható a chimérisztus foka az alábbi összefüggés szerint.

Donor

$$\text{Chimérisztus foka (\%)} = \frac{\text{Donor + Recipiens}}{\text{Donor + Recipiens}} \times 100$$

Donor + Recipiens

Megfigyeléseink szerint a myeloid és lymphoid sejtek között elértő lehet a donor-host sejtarány (*lymphoid és myeloid chimérisztus*). Ismételt teszteleseink alkalmával lehetőségünk nyílt folyamatosan és egyidejűleg nyomon követni a lymphoid és myeloid chimérisztus alakulását a transzplantációt követő 4-5 hónapon keresztül.

Eredményeink szerint a csoportok túlnyomó többségében ún. *hasadti chimérisztus* figyelhető meg. Érdekes és figyelemreméltó adat, hogy az első 5 hónapban a myeloid sejtek kizárólag donor (palkány) eredetűek (*tiszta myeloid chimérisztus*). Ezzel szemben a BALB/c recipiensében egér és palkány lymphocyták is kimutathatóak voltak, palkány dominanciával, ami *kevert lymphoid chimérisztus* kialakulására utal.

Kiméleti adataink több tanulságot is hordoznak. Bár az irradiáció körülményei

illetően a csoportok homogennek tekinthető, az ismételt donor-recipiens sejtarány megállapítása után kitűnik, hogy a chimérisztus egyedi varianciát mutat. A csoport többségében a kezdeti magas (60-80%) palkány celluláris átmenetileg csökkent, majd ismét emelkedett, megközelítve a 100%-os palkány sejtarányt (*stabil chimérisztus*). Valószínűnek tartjuk, hogy a kezdeti magas donor sejtarány a transzplantált, gyorsabb differenciálódási potenciállal rendelkező elkötelezett progenitor sejtek kiérésének következménye. A későbbi, de tartós donor celluláris csak azt követően alakul ki, amikor a transzplantált hemopoetikus őssejtek esetén már kialakult az egyensúly a nyugvó, önmegújulásra képes és a differenciálódó alakok, ill. a xenogén csoportbeli stróma komponensek között. A stabilitás semmiképp sem a palkány-egér sejtösszetétel állandóságát jelenti, hiszen a donor-host sejtek aránya dinamikusan változik, hanem a donor lymphocytáknak a xenogén mikroköznyezetbe való kompatibilitását jelzi.

Néhány, ritka esetben a *reverzió* jelensége figyelhető meg. Feltételezéseink szerint a korai, viszonylag alacsony (<50%) donor sejtarány nem kedvez a tartós chimérisztus kialakulásának. Nem egyedi grafit rejekcióról van szó, hiszen a transzplantációt letáplis irradiáció előzte meg: sokkal inkább a transzplantált hemopoetikus sejtek számának, ill. funkcióképességének elégtelenségét tartjuk valószínűnek. Ilyenkor a kielégítően növekedő, fizikailag egészségesnek mondható, normális leukocytá számmal rendelkező egyedben a tesztelesek alkalmával a lymphocyták 80-100%-a recipiens (egér) eredetű.

A transzplantációt követő 8-10 hónap eltelével a FL → BALB/c csoport minden tagja reverzálódik, perifériás vérmintákban (és nyirokszövetekben) palkány lymphocytákat nem tudunk kimutatni. Megfigyeléseink szerint a reverzió korai jelenék tekinthető, ha a myeloid chimérisztus keverté válik, tehát megjelennek az egér eredetű granulocyták is.

Tesztelésünk során megfigyeltük, hogy a donor (patkány) sejtek azonosítására használt OX-1 egér IgG1 mAb az anti-egér-IgG1 másodlagos antitestrel történő előhívás során nem kizárólag a lymphoid-myeloid elemek azonosítására alkalmas, hanem heterogén jelölődése a T-B lymphocyták arányával is korrelálható.

Összegezve, az általunk használt két lépésben kivitelezhető, két komponensű jelöléskombináció lehetővé teszi a patkány → egér chimérik donor és recipiens eredetű sejteinek teljes mértékű fenotipizálását.

5.5.2. Patkány lymphocyták funkcionális vizsgálata FL → BALB/c chimériákban

Teljesen xenogén immunizálási protokoll esetén, amikor patkányi ismétellen olunk egér lymphocyttal, a sérumban keringő antigén specifikus antitestek titeré igen magas. FACS tesztelés alkalmazásával több százszoros sérumban hiányos és legalább 2 nagyságrendnyi különbség észlelhető az immunizálás előtti állapothoz képest. Az FL → BALB/c chimériákban indukálható, a recipiens egér antigénnel szemben kialakuló allogén specifikitási patkány eredetű antitestválasz (saját terminológiánk szerint: xeno-allo-reakció) kimutatható ugyan, mértéke azonban messze elmarad a teljesen xenogén körülmények között tapasztaltakkal.

A grafit versus host reakció (GVHR) és a grafit reakció-mentes tartós, kevert chimériszmus jelenléte feltételezi a xenogén tolerancia kialakulását mind a donor, mind a recipiens érett lymphocyták részéről. Eredményeink viszont azt mutatják, hogy a chimériákban differenciálódó patkány lymphocyták nem csak a recipiens antigéneivel szemben toleránsak, hanem nem képesek kielégítő választ produkálni a recipienshez képest alloantigénekket sem tehát a xenogén tolerancia valószínűleg nem, vagy csak kismértékben (MHC vagy egyéb) allogén-specifikus.

5.5.3. FL → SCID chimérik analízise

Eredményeink szerint a FL → SCID egyedekben életveszély, tiszta chimériszmus alakult ki. A recipiens scid defektusából adódóan – a várakozásnak megfelelően – a lymphocyták kizárólag donor (patkány) eredetűek voltak. A granulocyttakat illetően adataink eltérőek. A különböző csoportokban a más időpontokban előállított FL → SCID egyedek esetén a myeloid sejtek donor-recipiens aránya eltérő volt. Ismert, hogy a scid mutáció csak az antigén-receptorral rendelkező sejteket (T- és B-lymphocyttakat) érinti, tehát a granulocytták (a károsodott perifériás nyirokcszöveti stróma függvényében) többé-kevésbé normálisan jelen vannak. Ezek ismeretében könnyen interpretálható az az adat, amely szerint az FL → SCID chimérik myeloid sejtei donor és recipiens eredetűek egyaránt (kevert myeloid cellularitás), tehát a chimériszmus ebben a csoportban is hasadhat mondható. Emellett azonban sikerült olyan FL → SCID csoportot is létrehozunk, ahol tiszta lymphoid és myeloid chimériszmust figyeltünk meg, minden tekintetben donor eredetű sejtekként.

5.5.4. Patkány lymphocyták funkcionális vizsgálata FL → SCID chimériákban

A SCID egerekben differenciálódó patkány eredetű T- és B-sejtekben a periférián keringő érett lymphocytták hiányában nem alakulhat ki tolerancia az egér lymphocyta antigénekkel szemben. Viszont toleránsnak lesznek minden olyan egér antigénnel szemben, amelyet nem-lymphoid sejtek expresszálnak (MHC II osztályú antigének, CD45 a myeloid sejteken, Thy-1 antigén a nephronok glomeruláris sejtjein, MHC I. osztályú antigének minden magas sejtben, stb.). A fenti szemtoleráns állatmodell lehetőségét feltételezve a FL → SCID chimérik esetében alkalmazott immunizálási protokoll, mely szerint BALB/c lépősejteket használtunk immunizáló ágensként, arra irányult, hogy olyan egér lymphocyta antigéneket ismerjünk meg, amelyek teljesen

xenogén immunizálás esetén nem kerülnek előtérbe, hiszen olyankor az immunválasz túlnyomórészt a magas denzitású antigének ellen irányul. Eredményeink azt mutatják, hogy a FL→SCID egyedekben igen csekély mértékű patkány immunválasz volt indukálható, az egyelőre nehezen is definiálható antigénekkel szemben. Ennek okát keresve felvetődik, hogy a válaszkeptelenség a transzplantációt követő szekunder immundeficiencia eredménye vagy a patkány lymphocyták részről nagyfokú tolerancia kialakulása, (esetleg mindkettő).

5.5.5. BM→SCID chimérikák

Adataink a patkány tejjes csoportjelőséjekkel repopulált SCID egerekről egyelőre hiányosak, a belőlük levont következtetések jórészt feltételezéseken alapulnak.

A csoport minden tagja életreszóló, tiszta chimérának bizonyult, tehát mind a lymphocyták, mind a granulocyták donor (patkány) eredetűek voltak, hasonlóan az FL→SCID csoporthoz. Ugyanakkor senyvesztő betegségre utaló klinikai tüneteket (nagyfokú súlyvesztés, szájhullás, anémia, bőrvérzések) mutattak, amelyek 5-6 hónap alatt az állatok elhullását eredményezték. Feltételezzük a tejjes csoportjelőséjű transzplantált éretl lymphocyták által kiváltott graft versus host reakció, amelyet a ledit moribund állatok szövettani vizsgálata és a foglyással egyidejűleg észlelt lépmeagyobobodás aláánasztrani látszott.

Csoport	Donor	Recipiens	Chimérisztmus		Reverzáló
			Lymphoid	myeloid	
1.	FL	BALB/c	kevert	tiszta	van
2.	FL	SCID	tiszta	tiszta (kevert)	nincs
3.	BM	SCID	tiszta	tiszta	nincs

1. táblázat. A transzplantált egerekben megfigyelhető donor-recipiens sejtösszetétel.

A különböző donor-recipiens kombinációban a chimérisztmus tekintetében megfigyelt adatainkat az 1. táblázat foglalja össze. Eredményeink azt mutatják, hogy BALB/c recipiensnek esetén tartós, kevert ábrnemeti chimérisztmus alakul ki. SCID recipiensekben a tiszta chimérisztmus életreszóló, viszont a 2. csoportban előfordulhat kevert myeloid cellularitás. Az életreszóló, tiszta chimérisztmus mellett a 3. csoport tagjai krónikus GVHR jeleit hordozzák.

5.5.6. A lépstruktúra vizsgálata a transzplantált egerekben. Tartós összeférhetőség a lép strómakomponensei és a xenogén eredetű lymphocyták között

A patkány lymphocyták egér nyirokszövetekbe történő migrációjának, ill. szöveti kompartmentalizációjának tanulmányozására immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. Ezek során a patkány lymphocyták egér stróma komponensekhez viszonyított ko-lokalizációját elemeztük az IBL-7/1 és IBL-7/22 mAt-ek segítségével. E szelektív vascularis vizsgálat lehetővé teszi a T/B sejt-asszociált területek (PAIS, folliculusok) láthatóvá tételét a lymphocyták jelölése nélkül. Mind az FL→BALB/c és az FL→SCID chimérikában a patkány (anti-κ) és egér B-sejteket (anti-IgM) egyidejűleg az IBL-7/1, vagy az IBL-7/22 antitestrel jelölve azt a figyelemreméltó adatot észleltük, hogy a donor eredetű patkány lymphocyták recirkulálnak az egér mikrokozmoszban és részei vesznek a fehér pulpa T-B sejtjes kompartmentalizációjában. E megfigyelés arra enged következtetni, hogy a homing, a recirkuláció és a lymphocytá-endothel (ill. egyéb stróma eredetű) interakciókban kulcsszerepet játszó molekulafajok (integrinek, egyéb adhéziós molekulák, chemokinek stb.) nem, vagy legalábbis nem kizárólag species specifikusak.

6. Megbeszélés

A lép egyedülálló immunológiai fontossággal rendelkező szerv, amelyben a lymphoid és egyéb hemopoetikus elemek a vasculatúra köré rendeződnek. Ellenlétben a rendelkezésre álló, myeloid és lymphoid alcsoportokat leíró kimerítő elemzésekkel, a komplex vascularis szerveződés alapelvei csak részben ismertek, különös tekintettel az endothel és hemopoetikus eredetű sejtek molekuláris és celluláris interakcióira.

Jelen tanulmány értékes adatokkal járul hozzá a lép biológiai funkcióinak pontosabb részleteihez, felátvra az endothel fenotípusos és fejlődéstanai sokoldalúságát, feltételezve a vasculatúra regionális funkcionális specializálódását.

Szomatikus sejtfűzítővel több, a lép érelenei felismerő monoklonális antitestet állítottunk elő. Ezek közül a legnagyobb szelektivitást mutató három klónt izoláltunk és segítségével leírtuk a lép anatómiai kompartmentjeinek addig még ismeretlen vascularis sokféleségét, részletezve mind a vörös pulpa erezettségét, mind pedig a fehér pulpa lymphoid állományának specializált mintázatát. Az IBL-9/2 antitest szelektíven jelöli a vörös pulpa endotheljét, a lép többi részén és egyéb szervekben nem mutat reaktivitást. Az IBL-7/1 mA-t erős reaktivitással jeleníti meg a marginális sinus endothelt, kisebb konfluens sinusoidális jelölődéssel a fehér pulpán belül; a vörös pulpában különféle intenzitási ereket találhatunk. Az IBL-7/22 a centrális arteriola, a marginális sinus és a vörös pulpa endothel reaktivitás mellett szelektíven jelöli a T-seji zóna (PALS) retikuláris hálózatát, follikuláris reaktivitása elenyésző. Különféle endothel specifikus antitestjeinket használva azt találtuk, hogy a felnőttben megfigyelhető erős marginális sinus reaktivitás mellett az IBL-7/1 további szelektivitást mutat a vörös pulpán belül. Néhány vörös pulpa sinusoid hasonló intenzitással jelölődött, mint a marginális sinus (IBL-7/1th), míg mások sokkal gyengébben (IBL-7/1th). Az utóbbi alcsoport IBL-9/2 mA-tal őrtenő szelektív, intenzív jelölődése megerősítette a fenotípusos különbséget az

endothelialis alcsoportok között. Ezen túlmenően adoptív sejtranszfer kísérletekkel funkcionálisan aláírtástottunk az elemte kizárólag fenotípusosnak tűnő különbséget, leírva, hogy a jelölt lymphocyták sokkal inkább az IBL-7/1, mint az IBL-9/2 antigént expresszáló endothelhez asszociálódnak, függetlenül a sejtek aktuális lokalizációjától (vörös pulpa v. marginális zóna). Ez a komplex fenotípus párhuzamba hozható a vörös pulpa sinusoidok chemokín (CXCL16 ill. SDF-1) termelő funkcionális sajátosságával, amely valószínűleg a CD8 pozitív T sejtek és lehetséges módon a fehér pulpát elhagyó plazmasejtek vörös pulpa irányú migrációját szabályozza.

Érdekes adatnak tekintjük, hogy ezen lép endothel kompartmentek a születéskor már kezdetleges formában jelen vannak. E megfigyelés arra enged következtetni, hogy a lép endothel érése és fenotípusos diverzifikációja az intrauterin angiogenezis során jelentős mértékben kialakul. A vörös pulpa felnőttkori mintázata valószínűleg korábban kialakul (a születést követő első hét), mint a marginális sinus rajzolat, amely teljes érése a negyedik hétre tehető. Azt feltételezzük, hogy a marginális sinus teljes kialakulása valamilyen fokig a lymphoid kolonizáció és a fehér pulpa kompartmentalizálódásának függvénye, amelyet aláírtást a MadCAM-1 pozitív marginális sinus hiánya *aly* és *Rag-1* mutáns egerekben. Saját előzetes megfigyeléseink nem mutattak eltérést SCID egerak vasculatúrájának kialakulásában, amely alapján állítjuk, hogy ezen struktúrák az érett T- és B-sejtektől függetlenül képződnek.

Kísérleteinkből arra következtelhetünk, hogy a folyamatos (centrális arteriola típusú) és a nem folyamatos (sinusoid típusú) endothelialis struktúrákon kívüli a fenotípus és a lokalizáció alapján legalább háromféle endothel alcsoport különírtelhető el a vörös pulpa és a marginális zóna tájékáról.

Megfigyelések az anti-humán sinus endothelialis (MS-1) mA-tal az IBL-9/2-höz hasonló jelölődésmintát írtak le, azzal a különbséggel, hogy az MS-1 antitest más

szervekben is mutat endothelialis és dendritikus sejtekre kiterjedő reaktivitást, az IBL-9/2 sokkal szelektívebb mintázatával szemben. Az endothel alcsoportok létét az is valószínűvé teszi, hogy lép eredetű vascularis tumorok fenotípusos elenzése során bebizonyosodott a 'sinus' eredet (CD31+, CD34, CD68+ és CD21+). Néhány ezen sejtfélszini antigének közül a mononucleáris phagocytá és dendritikus sejtsoportokon is expresszáldók, felteve ezen sejtvonalak közötti fejlődéstanai kapcsolatot. Az IBL-7/1 antigén expressziója neonatális B sejteken, erythroid prekursorokon és a fejlődő marginális sinus endothel sejteken szintén megerősíti a fejlődéstanai rokonság valószínűségét az endothelium és a hemopoetikus sejtvonalak között. E fejlődéstanai kapcsolat részletei az elmúlt években kerültek napvilágra *Shin-Ichi Nishikawa és mtsai* által: eleinte különböző korú embrionális szövetekből sikeresen előállított és fenotíprizált endothel és hemopoetikus sejtekkel. Defináltak egy ún. közös, még el nem kötelezett HEC (hemogenic endothelial cell) sejtípust, amely hemangioblastokból differenciálódik és bejőle mind átmenei definitív hemopoetikus sejtek, mind LTRSC (long term recirculating stem cells), mind pedig elkötelezett endothelialis sejtek kialakulhatnak. Majd ezen folyamatok *in vitro* molekuláris szimulációjával leírták, hogy IV. típusú collagenel fedett Petri csészében az embrionális szövetek indukáló hatásának hiányában is előtérbe kerül a VEGFR2 (vascular endothelial growth factor type 2) pozitív endothelialis progenitor sejtek differenciálódása. A belőlük fejlődő endothel sejteket a CD31, CD34, VE-cadherin markerrek és acetylált LDL felvétele alapján azonosították. Az IBL-7/1 antigén expressziója a lép B-sejteken átmenetnek bizonyult és felnőttkorra (negyedik postnatális hét) az érett B-sejteknek csak egy kisebb funkcionálisan különálló alcsoportjára korlátozódott (B220⁺, IgM⁺/IgD⁺, CD21⁺/CD23⁺, nagymeretű, marginális zóna B-sejtek. Szemben a lép átmeneti IBL-7/1 expressziójával, a csoportvelelő erythroid prekursorok reaktivitása felnőttkorra is megmaradt.

További, a hemopoetikus és az endothelialis sejtvonalak differenciálódását vizsgáló tanulmányok szintén sokat sejtetőnek ígérkeznek az endothelialis heterogenitús fejlődéstanai aspektusainak feltárásában, különös tekintettel a csoportvelelő eredetű, recirkuláló endothelialis sejtek leírása.

A lép és egyéb nyirokcszövetek lymphoid kompartmentalizációja jórészt teljes részletéig ismert. A xenogén chiméramokban látható teljes mértékű kompatibilitás a donor eredetű (patkány) T- és B-lymphocyták és a recipiens (egér) lép stróma között értelmes adatnak tekinthető. E kompatibilitás feltételei között meg kell jegyeznünk, hogy minden valószínűség szerint a patkány B-sejtek effektíven migrálnak az egér BLC (B-lymphocyte chemoattractant) irányába, valamint az egér thymus stróma –a transzplantációt követően bevándorló patkány antigén prezentáló sejtekkel- optimális feltételeket biztosít a patkány T-lymphocyták differenciálódásához.

Jelen tanulmányban összefoglalunk az általunk készített antitestekkel a lép biológiájáról nyert adatainkat és következtetéseinket, amelyek figyelemreméltó kiegészítésként hozzájárulnak nemcsak a lymphocytá recirkuláció és lymphoid kolonizáció fiziológiás folyamatainak pontosabb megértéséhez, de a jövőben a lép funkciójából adódóan a vértárammal érintő bakteriális patogének hatásmechanizmusának tanulmányozásában is hasznos segítséget nyújthatnak.

7. Az új eredmények összefoglalása

7.1. Egyedi specificitású, az egér lép sinusoidokat regionális szelektivitással jelölő monoclonális antitestek előállítása (IBL-7/1, IBL-7/22 és IBL-9/2). Ezek segítségével három, funkcionálisan eltérő sinusoid kompartment elkülönítése. Az IBL-7/1+ sinusoidok és lymphocyták asszociációjának *in vivo* bemutatása.

7.2. A lép fejlődéstani kompartmentalizációjának leírása az IBL-7/1, IBL-7/22 és IBL-9/2 monoclonális antitestek segítségével.

7.3. A hemopoetikus és endotel sejtvonalak fejlődéstani rokonság elméletének támasztása: az IBL-7/1 antigén expressziójának kimutatása neonatális B-sejteken, erythroid precursorokon és marginális sinus endotel sejtjein.

7.4. Stabil kevert (FL → BALB/c), ill. tiszta (FL → SCID) patkány-egér xenogén chimeraék előállítása. E modellek segítségével rágcsáló fajok közötti lymphocytá-endotel kompatibilitás igazolása, valamint a donor és recipiens toleranciájának jellemzése.

8. A szerző tudományos közleményeinek listája:

Cikkek:

1. Balazs, M., Grama, L. and Balogh, P. 1999. Detection of phenotypic heterogeneity within the murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies IBL-7/1 and IBL-7/22. *Hybridoma* 18, 177-82.

2. Balazs, M., Horvath, G., Grama, L. and Balogh P. 2001. Phenotypic identification and development of distinct microvascular compartments in the postnatal mouse spleen. *Cellular Immunology*. 212.2, 126-137.

3. Balazs, M., Horvath, G. and Balogh, P. 1998. Simple determination of donor/host origin and donor leukocyte subsets in rat-mouse chimeras. *J Immunol Methods* 218, 117-121.

4. M. Balazs, F. Martin, T. Zhou and J. F. Kearney (2002) Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*, 17(3): 341-352.

5. Czompolny T, Labadi A., Balazs M., Nemeth P., Balogh P. (2003) Use of cyclic peptide phage display library for the identification of a CD45RC epitope expressed on murine B cells and their precursors. *Biochem Biophys Res Commun*. 307(4): 791-6.

Publikált absztraktok:

6. M. Balazs, F. Martin and J. F. Kearney (2000) Chemokine receptor expression of murine B lymphocyte subsets. *FASEB J*, 14(6): 1190.

7. P. Balogh, M. Balazs and G. Horvath (2000) Heterogeneity of murine sinus endothelium: distribution, phenotype and homing preference. *FASEB J*, 20, 14(6): 1148.



8. M. Balazs, F. Martin and J. F. Kearney (2001) Functional interplay between granulocytes, dendritic cells and antigen-specific B cells to initiate the T-independent immune response. *FASEB J*, 15(40): 311.

9. M. Balazs, F. Martin and J. F. Kearney (2002) Functional interactions between CD11c⁺ dendritic cells and antigen-specific B cells to initiate the T-independent immune response. *FASEB J*.