Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

AZ EGÉR LÉP VASCULARIS STRÓMA SOKSZÍNŰSÉGE: FENOTÍPUSOS, FUNKCIONÁLIS ÉS FEJLŐDÉSTANI JELLEGZETESSÉGEK

PhD tézisek

Dr. Balázs Mercedesz

Témavezető: Dr. Balogh Péter

Alprogramvezető: Dr. Németh Péter

2003

Tartalomjegyzék

1. Előszó 2

2. Bevezetés 3

3. Specifikus célkitűzések 5

4. Kísérletes körülmények 6

5. Eredmények 8

6. Diszkusszió 18

7. Új eredmények összefoglalása 22

8. A szerző publikációs listája 23

1. Előszó

A lép kiemelkedő fontosságú hemopoetikus és perifériás nyirokszervünk. Egyedi -és jelenleg helyettesíthetetlennek tűnő- szerepét igazolják azok a tanulmányok, amelyek splenectomizált egyedek, valamint (a megfelelő prekurzor lymphocyták és akcesszórius sejtek defektusából adódóan) csecsemők és időskorúak bizonyos baktériumokkal szembeni esendőségét demonstrálják. Az elmúlt évtizedek makroszkópos és hisztológiai leírásai alkalmával sejtösszetétele és hemopoetikus kompartmentalizációja kimerítő ismeretekkel szolgál, ugyanakkor a vascularis szerveződését illetően kevés adatra hagyatkozhatunk.

Jelen tanulmány célja, hogy betekintést nyújtson a lép vascularis strómaállományának 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 postnatalis fejlő-déstani szekvenciáját és alátámasztja a feltételezett fejlődéstani kapcsolatot az endotheliális és lymphoid sejtvonalak között. A morfológiai heterogenitás mellett funkcionális különbségeket tárunk fel a lép endothel alcsoportjai között. Végül összefoglaljuk törekvéseinket egy xenogén chiméra modell kialakítására, amellyel az endotheliális komponenseken túlmenően a lépbe való bevándorláshoz szükséges lymphocyta sejtfelszíni antigének felderítését tűztük ki célul.

Ezen új adatokkal hozzájárulunk a lép vascularis elemek fejlődéstani rejtelmeinek felderítéséhez, leírjuk a vascularis kompartmentek fenotípusos és funkcinális sokoldalúságát, amellyel új perspektívákat nyitunk nem csak a lép anatómiájának részletesebb feltárásában, hanem a vérárammal érkező pathogének feldolgozásában, eltávolításában résztvevő komponensek kiegészítésében.

2. Bevezetés

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

A lép a vérárammal érkező pathogének, főként idegen antigének eliminálásában kulcsszerepet betöltő perifériás nyirokszerv. A struktúrája ennek a funkciónak az optimális betöltéséhez igazodik. Két fő, funkcionálisan szorosan összefonódó egységre, vörös és fehér pulpára tagolódik. Előbbi, főként vörösvérsejteket, és myeloid elemeket: macrophagokat és neutrophil granulocytákat tartalmaz, míg a fehér pulpa lymphocytákból és különféle myeloid szubpopulációkból képez önálló funkcionális 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-sejtes 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 sejtsor vastagságú gyűrűszerű rétege képezi, amellyel szoros kapcsolatban van a lymphocyták belépési helyéül szolgáló marginális sinus. E struktúrák szintén fizikai választóvonalat képeznek a lép funkcionálisan eltérő B-lymphocyta alcsoportjai között: proximálisan találhatók a B-sejt follikulusok, nyugvó, naív, recirkuláló B-lymphocytákkal, folliculáris dendritikus sejtekkel, néhány macrophaggal és helper T-sejtekkel, míg a sinustól distalisan 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 'lymphocyta-tranzit'-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. Lymphocyta recirkuláció nyugalmi állapotban és antigén aktivációt követően

A csontvelőből és thymusból érkező, érett, naív B- és T-lymphocyták recirkulációjuk során a marginális sinuson keresztül hagyják el a vérpályát és lépnek be a lépbe, ahonnan a különféle lymphocyta alcsoportokra szelektíven ható chemoattraktikus hatású cytokinek (továbbiakban chemokinek) irányítják útjukat. Az antigén által aktivált B-sejtek a follikulusból és marginális zónából a gyulladásos és a kompartmentalizációért felelős chemokin egyensúly eltolódása következtében a T- és B-sejt zóna határára vándorolnak, ahol fizikai kontaktusba kerülhetnek T-lymphocytákal, amely lehetőséget biztosít az esetleges T-sejtes kostimulációra. A plasmablastok ezután az összekötő 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 vascularis 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, morfológiai és funkcionális vonatkozásainak felderítésében.

3. Célkitűzések

I. Egér lép vascularis strómakopmonenseket felismerő patkány monoklonális antitestek előállítása, jellemzése. A másodlagos nyirokszövetek vascularis sajátságainak leírása.

II. Az egér lép vascularis kompartmentjei fejlődésének feltárása a születéstől a felnőttkori sruktúra kialakulásáig.

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

4. Kísérletes körülmények

4.1. Monoklonális antitestek előállítása

Előzetesen irradiált BALB/c egerek lymphocyta mentes lépsejtjeivel ismételten immunizáltunk Wistar patkányokat és lépükből szomatikus sejtfúziót végeztünk a szokásos hybridoma protokoll szerint. 3x800 hybridoma klónt immunhisztokémiával teszteltük és a jelölés mintázat alapján hármat további vizsgálatok céljából szelektáltunk.

4.2. Antitestek

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

4.3. FACS analízis

Az újszülött és felnőtt lép, valamint a nyirokcsomó, thymus, és csontvelőn egyszeres, 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, konfokális mikroszkópia

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat acetonban fixált fagyasztott szövetekből 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 konfokális 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 felnött patkány teljes csontvelőjének ill. 14 napos embryonális patkány májsejtjeinek transzplantációjával radiációs chimérakat készítettünk 3 kombinációban: FL→BALB/c, FL→SCID es BM→SCID. 4 héttel a rekonstitúció után 2 hetenként a szemgzugból vett perifériás vérből FACS analízissel meghatároztuk és egyedenként követtük a chimérizmus fokát.

4.6. A patkány lymphocyták funkcionális vizsgálata. Immunizálási 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 paraformaldehydben (1%, PBS-ben) fixált BALB/c egér lépsejtjeivel immunizáltuk. Mindkét csoportban a 3. immunizálást követően az antigén-specifikus patkány immunglobulinok jelenlétét FACS vizsgálattal mutattuk ki, target sejtként az immunizáláshoz használt EL-4, ill. BALB/c lépsejteket használtunk.

5. Eredmények

5.1. Az IBL-7/1, IBL-7/22 és IBL-9/2 mAt-ek szöveti reaktivitása. Endotheliális heterogenitás az egér lépben

Az előzetes tesztelések során többféle specificitású klónokat figyelhettünk meg. Ezek közül további vizsgálatok céljából kiválasztottuk az IBL-7/1, IBL-7/22 és az IBL-9/2-t, amelyek eltérő jelölődést mutattak a lép vasculatúra különféle 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^{hi} és IBL-7/1^{lo}. A thymusban az IBL-7/1 pozitív erek a kéreg és velőállományban egyenlő eloszlást mutattak. Az antitest a nyirokcsomó metszeten nem mutatott reaktivitást.

Az IBL-7/22 a lépben intenzíven jelöli a capilláris endothelt, a centrális arteriolát, valamint kifejezett reaktivitást mutat a vörös pulpa endotheliális 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 endotheliális jelölődés mellett a léphez hasonló retikuláris mintázatot figyelhetünk meg. Az IBL-7/22 a nyirokocsomóban a magas endothelű venulákat intenzíven jelöli, valamint eltérően a két másik kiválasztott klóntól, minden általunk vizsgált szerv capillaris halózatát 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 figyelemreméltóan 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 luminális reaktivitást figyelhettünk meg a vörös pulpa sinusoidok egy alcsoportján.

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

A lép vasculatura 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-endotheliális (IBL-7/22 és anti-CD31) antitestet. *Újszülött egérben* (fiatalabb, mint 12 óra), minden vascularis struktúra komponens jelen van, bár elrendeződésük jelentősen eltér a felnőttkorban megfigyelhetőtől. *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 ellenanyaggal. Meg kell jegyezni azonban, hogy a sinus még nem vált folyamatos struktúrává, amit az IBL-7/1 reaktivitásában látható hiányosságokként észlelhettünk. Az IBL-7/1 pozitív lymphocyta reaktivitás még mindig megfigyelhető. Az IBL-9/2 pozitiv sejtek összefüggő, sinusoidális hálózatra emlékeztő rajzolata megkezdődött. *Három hetes* korra kialakult a felnőttre jellemző vascularis struktúra. A marginális sinus közel folyamatos régióként látható, elválasztva a fehér pulpa belső részeit a marginális zónától. Ezzel egyidejűleg a fehér pulpa is tökéletesen kompartmentalizálódott T-és B-

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

5.3. Feltételezett fejlődéstani kapcsolat a B-lymphoid és az endotheliális sejtvonalak között: a marginális sinus endothel antigén átmenetileg expresszálódik újszülöttkori B lymphocytákon és erythroid sejteken

Ellentétben a felnőtt lépből szerzett adatokkal, ahol a lymphocyta populációnak csekély hányadán figyelhetünk meg IBL-7/1 jelölődést (ld. később ebben a fejezetben), az újszülöttkori lépsejtek (FACS analízissel meghatározott lymphoid kapu sejtjei) jelentős frakciója IBL-7/1 pozitívnak bizonyult. Az IBL-7/1 antigén megtalálható mind az erythroid, mind B-sejteken, ugyanakkor nem expresszálódik a T- és monocyta vonal sejtjein. A B-sejteken belül mind a sejtfelszíni IgM-et és IgD-t hordozó sejteken jelen van. A korai B-sejt "érési" markerekkel (*c-kit* és CD43) azonosított alcsoportokon megfigyelt expresszióból arra következtethetünk, hogy az IBL-7/1 antigén valamikor a pro/pre B stádium átmenetében jelenik meg újszülöttkorban.

Felnőttkorra 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 korreláltatható a B-sejtek sejtfelszíni Ig izotípus mintázatával. Az IBL-7/1 negatív B lymphocyták IgM^{lo}/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 történő elhelyezkedésével (marginális zóna, ill. follikulus).

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

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

Összefoglalva a fenotípus elemzés során megfigyelteket, 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 minimálisra csökken a csontvelői előalakokon.

5.4. A lépbe történő lymphocyta migráció: fizikai kapcsolat a marginális sinus endothel és adoptív sejttranszferrel bejuttatott lépsejtek között

A vizsgált antitestek közül az IBL-7/1 és az IBL-7/22 *in situ* jelöli a lymphocyták érpályából történő kilépési helyeként ismert marginális sinust. 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. Meglepetésként 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 endotheliális elemekkel asszociálódtak.

5.5. A patkány→egér chimérák analízise

'Lép homing'-gal asszociálható egér lymphocyta specifikus antigének vizsgálatára xenogén hemopoetikus chimérákat állítottunk elő több donor-recipiens kombinációban. A donor hemopoetikus szövetből fejlődő lymphocyták és granulocyták (nagy valószínűséggel más hemopoetikus sejtekkel együtt, amelyekre viszgálataink nem terjedtek ki) a rekonstitúciót követő 4 héten belül megjelentek a perifériás vérben.

5.5.1. A chimérizmus fokának meghatározása és nyomonkövetése

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

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

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

Megfigyeléseink szerint a myeloid és lymphoid sejtek között eltérő lehet a donor-host sejtarány *(lymphoid és myeloid chimérizmus)*. Ismételt teszteléseink alkalmával lehetőségünk nyílt folyamtosan és egyidejűleg nyomon követni a lymphoid és myeloid chimérizmus alakulását a transzplantációt követő 4-5 hónapon keresztül.

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

Kinetikai adataink több tanulságot is hordoznak. Bár az irradiáció körülményeit illetően a csoportok homogénnek tekinthetők, az ismételt donor-recipiens sejtarány megállapítása után kitűnik, hogy a chimérizmus egyedi varianciát mutat. A csoport többségében a kezdeti magas (60-80%) patkány cellularitás átmenetileg csökkent, majd ismét emelkedett, megközelítve a 100%-os patkány sejtarányt (*stabil chimérák*). Valószínűnek tarthatjuk, hogy a kezdeti magas donor sejtszám a transzplantált, gyorsabb differenciálódási potenciállal rendelkező elkötelezett progenitor sejtek kiérésének következménye. A későbbi, de tartós donor cellularitás 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 csontvelői stróma komponensek között. A stabilitás semmiképp sem a patkány-egér sejtösszetétel állandóságát jelenti, hiszen a donor-host sejtek aránya dinamikusan változik, hanem a donor lymphocytáknak a xenogén mikrokörnyezethez való kompatibilitását jelzi.

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

A transzplantációt követő 8-10 hónap elteltével a FL→BALB/c csoport minden tagja revertálódik, perifériás vérmintáikban (és nyirokszöveteikben) patkány lymphocytákat nem tudtunk kimutatni. Megfigyeléseink szerint a reverzió korai jelének tekinthető, ha a myeloid chimérizmus kevertté válik, tehát megjelennek az egér eredetű granulocyták is.

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

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

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

Teljesen xenogén immunizálási protokoll esetén, amikor patkányt ismételten oltunk egér lymphocytákkal, a szérumban keringő antigén specifikus antitestek titere igen magas. FACS tesztelés alkalmával több százszoros szérum hígítás esetén is legalább 2 nagyságrendnyi különbség észlelhető az immunizálás előtti állapothoz képest. Az FL→BALB/c chimérákban indukálható, a recipiens egér antigénekkel szemben kialakuló allogén specificitású patkány eredetű antitestválasz (saját terminológiánk szerint: xeno-allo-reakció) kimutatható ugyan, mértéke azonban messze elmarad a teljesen xenogén körülmények között tapasztaltakkal.

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

5.5.3. FL→SCID chimérák analízise

Eredményeink szerint a FL→SCID egyedekben életreszóló, tiszta chimérizmus alakult ki. A recipiens *scid* defektusából adódóan – a várakozásnak megfelelően – a lymphocyták kizárólag donor (patkány) eredetűek voltak. A granulocytákat 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-lymphocytákat) érinti, tehát a granulocyták (a károsodott perifériás nyirokszöveti stróma függvényében) többé-kevésbé normálisan jelen vannak. Ezek ismeretében könnyen interpretálható az az adat, amely szerint az FL→SCID chimérák myeloid sejtjei donor és recipiens eredetűek egyaránt (*kevert myeloid cellularitás*), tehát a chimérizmus ebben a csoportban is hasadtnak mondható. Emellet azonban sikerült olyan FL→SCID csoportot is létrehoznunk, ahol *tiszta lymphoid és myeloid chimérizmust* figyeltünk meg, minden tekintetben donor eredetű sejtekkel.

5.5.4. Patkány lymphocyták funkcionális vizsgálata FL→SCID chimérákban

A SCID egerekben differenciálódó patkány eredetű T- és B-sejtekben a periférián keringő érett lymphocyták hiányában nem alakulhat ki tolerancia az egér lymphocyta antigénekkel szemben. Viszont toleránsak 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 magvas sejten, stb.). A fenti szemitoleráns állatmodell lehetőségét feltételezve a FL→SCID chimérák esetében alkalmazott immunizálási protokoll, mely szerint BALB/c lépsejteket 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 válaszképtelenség a transzplantációt követő szekunder immundeficiencia eredménye vagy a patkány lymphocyták részéről nagyfokú tolerancia kialakulása, (esetleg mindkettő).

5.5.5. BM→SCID chimérák

Adataink a patkány teljes csontvelősejtekkel repopuláltatott 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, szőrhullás, anémia, bőrvérzések) mutattak, amelyek 5-6 hónap alatt az állatok elhullását erdményezték. Feltételeztük a teljes csontvelővel transzplantált érett lymphocyták által kiváltott graft versus host reakciót, amelyet a leölt moribund állatok szövettani vizsgálata és a fogyással egyidejűleg észlelt lépmegnagyobbodás alátámasztani látszott.

Csoport	Donor	Recipiens	Chimérizmus		Reverzió
			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 chimérizmus tekintetében megfigyelt adatainkat az **1. táblázat** foglalja össze. Eredményeink azt mutatják, hogy BALB/c recipiensek esetén tartós, kevert átmeneti chimérizmus alakul ki. SCID recipiensekben a tiszta chimérizmus életreszóló, viszont a 2. csoportban előfordulhat kevert myeloid cellularitás. Az életreszóló, tiszta chimérizmus 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 (PALS, follikulusok) láthatóvá tételét a lympocyták jelölése nélkül. Mind az FL→BALB/c és az FL→SCID chimérákban a patkány (anti-κ) és egér B-sejteket (anti-IgM) egyidejűleg az IBL-7/1, vagy az IBL-7/22 antitesttel jelölve azt a figyelemreméltó adatot észleltük, hogy a donor eredetű patkány lymphocyták recirkulálnak az egér mikrokörnyezetben és részt vesznek a fehér pulpa T-B sejtes kompartmentalizációjában. E megfigyelés arra enged következtetni, hogy a homing, a recirkuláció és a lymphocyta-endothel (ill. egyéb stróma eredetű) interakciókban kulcsszerepet játszó molekulapárok (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. Ellentétben a rendelkezésre álló, myeloid és lymphoid alcsoportokat leíró kimerítő elemzésekkel, a komplex vascularis szerveződés alapelemei csak részben ismertek, különös tekintettel az endothel és hemopoetikus eredetű sejtek molekuláris és celluláris interakcióira.

Jelen tanulmány értékes adatokkal járul hozzá a lép biológiai funkciójának pontosabb részleteihez, feltárva az endothel fentotípusos és fejlődéstani sokoldalúságát, feltételezve a vasculatúra regionális funkcionális specializálódását.

Szomatikus sejtfúzióval több, a lép érelemeit felismerő monoklonális antitestet állítottunk elő. Ezek közül a legnagyobb szelektivitást mutató három klónt izoláltuk és segítségükkel 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 mAt erős reaktivitással jeleníti meg a marginális sinus endothelt, kisebb konfluens sinusoidalis jelölődéssel a fehér pulpán belül; a vörös pulpában különféle intenzitású ereket találhatunk. Az IBL-7/22 a centrális arteriola, a marginális sinus és a vörös pulpa endothel reaktivitás mellett szelektíven jelöli a T-sejt 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-7/1^{hi}), míg mások sokkal gyengébben (IBL-7/1^{lo}). Az utóbbi alcsoport IBL-9/2 mAt-tel történő szelektív, intenzív jelölődése megerősítette a fenotípusos különbséget az

endotheliális alcsoportok között. Ezen túlmenően adoptív sejttranszfer kísérletekkel funkcionálisan alátámasztottuk az eleinte 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 chemokin (CXCL16 ill. SDF-1) termelő funkcionális sajátságával, 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 valamivel 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 alátámaszt a MadCAM-1 pozitív marginális sinus hiánya *aly* és *Rag-1* mutáns egerekben. Saját előzetes megfigyeléseink nem mutattak eltérést SCID egerek vasculatúrájának kialakulásában, amely alapján állíthatjuk, hogy ezen struktúrák az érett T- és B-sejtektől függetlenül képződnek.

Kísérleteinkből arra következtethetünk, hogy a folyamatos (centrális arteriola típusú) és a nem folyamatos (sinusoid típusú) endotheliális struktúrákon kívül a fenotípus és a lokalizáció alapján legalább háromféle endothel alcsoport különíthető el a vörös pulpa és a marginális zóna tájékáról.

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

szervekben is mutat endotheliális 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 elemzése során bebizonyosodott a 'sinus' eredet (CD31+, CD34-, CD68+ és CD21+). Néhány ezen sejtfelszíni antigének közül a mononucleáris phagocyta és dendritikus sejtcsoportokon is expresszálódik, felvetve ezen sejtvonalak közötti fejlődéstani kapcsolatot. Az IBL-7/1 antigén expressziója neonatális B sejteken, erythroid prekurzorokon és a fejlődő marginális sinus endothel sejteken szintén megerősíti a fejlődéstani rokonság valószínűségét az endotheium és a hemopoetikus sejtvonalak között. E fejlődéstani kapcsolat részletei az elmúlt években kerültek napvilágra *Shin-Ichi Nishikawa és mtsai* által: eleinte különböző korú embryonális szövetekből sikeresen előállított és fenotipizált endothel és hemopoetikus sejtekkel. Definiáltak egy ún. közös, még el nem kötelezett HEC (hemogenic endothelial cell) sejttípust, amely hemangioblastokból differenciálódik és belőle mind átmeneti definitív hemopoetikus sejtek, mind LTRSC (long term recirculating stem cells), mind pedig elkötelezett endotheliális sejtek kialakulhatnak. Majd ezen folyamatok *in vitro* molekuláris szimulációjával leírták, hogy IV. típusú collagénnel fedett Petri csészében az embryonális szövetek indukáló hatásának hiányában is előtérbe kerül a VEGFR2 (vascular endothelial growth factor type 2) pozitív endotheliális progenitor sejtek differenciálódása. A belőlük fejlődő endothel sejteket a CD31, CD34, VE-cadherin markerek és acetylált LDL felvétele alapján azonosították.

Az IBL-7/1 antigen expressziója a lép B-sejteken átmenetinek bizonyult és felnőttkorra (negyedik postnatális hét) az érett B-sejteknek csak egy kisebb funkcionálisan különálló alcsoportjára korlátozódott ($B220^{+}$, $IgM^{++}/IgD^{+/-}$, $CD21^{++}/CD23^{+/-}$, nagyméretű, marginális zóna B-sejtek. Szemben a lép átmeneti IBL-7/1 expressziójával, a csontvelői erythroid prekurzorok reaktivitása felnőttkorra is megmaradt.

További, a hemopoetikus és az endotheliális sejtvonalak differenciálódását vizsgáló tanulmányok szintén sokat sejtetőnek ígérkeznek az endotheciális heterogenitás fejlődéstani aspektusainak feltárásában, különös tekintettel a csontvelői eredetű, recirkuláló endotheliális sejtek leírása.

A lép és egyéb nyirokszövetek lymphoid kompartmentalizációja jórészt teljes részletekig ismert. A xenogén chiméráinkban látható teljes mértékű kompatibilitás a donor eredetű (patkány) T- és B-lymphocyták és a recipiens (egér) lép stróma között érdekes 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 összefoglaltuk az általunk készített antitestekkel a lép biológiájáról nyert adatainkat és következtetéseinket, amelyek figyelemreméltó kiegészítésként hozzájárulnak nemcsak a lymphocyta recirkuláció és lymphoid kolonizáció fiziológiás folyamatainak pontosabb megértéséhez, de a jövőben a lép funkciójából adódóan a vérárammal érkező bakteriális pathogének 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 asszociájójának *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 endothel sejtvonalak fejlődéstani rokonság elméletének támogatása: az IBL-7/1 antigén expressziójának kimutatása neonatális B-sejteken, erythroid precurzorokon és marginális sinus endothel sejtjein.

7.4. Stabil kevert (FL→BALB/c), ill. tiszta (FL→SCID) patkány-egér xenogén chimérák előállítása. E modellek segítségével rágcsáló fajok közötti lymphocyta-endothel 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. Czompoly 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^{lo} dendritic cells and antigen-specific B cells to initiate the T-independent immune response. *FASEB J.*