D 5149

MONOKLONÁLIS ELLENANYAGOK ELŐÁLLÍTÁSA HUMAN LEUKOCYTA INTERFERONNAL, VALAMINT CSIRKE SEJTFELSZÍNI ANTIGÉNEKKEL SZEMBEN

Egyetemi doktori

disszertáció

készítette:

Baranji Katalin

a

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem

Mikrobiológiai Intézetében

SZTE Egyetemi Könyvtár 14 SZEGED

Szeged, 1990

B 514

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14

SZENT-GYÖRGYI ALBERT ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM KÖZEGÉSZSÉGTANI KÖNYVTÁRA * SZEGED

E 3.330

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés 1

1.1. Monoklonális ellenanyagok 1

1.1.1. Monoklonális ellenanyagok szolubilis antigénekkel szemben 3

1.1.2. Monoklonális ellenanyagok sejtfelszíni antigénekkel szemben 6

1.2. A szárnyasok immunrendszerének sajátosságai 8

1.2.1. Bursa Fabricii 10

1.2.2. A thymus 12

1.2.3. A lép 13

1.2.4. Harder féle mirigy 14

1.2.5. A szárnyasok humorális immunválasza 14

1.2.6. A sejtes immunválasz 15

1.2.7. A lymphoid sejtek kooperációja a szárnyasok immunrendszerében 16

1.2.8. A természetes sejtközvetítette cytotoxicitás csirkékben 19

1.2.9. A szárnyasok thrombocytái 21

1.2.10. Monocyták és macrophagok szárnyasokban 22

1.2.11. A csirke MHC-je 24

1.2.12. Csirke eredetû lymphokinek 25

1.3. Csirkesejtekkel reagáló monoklonális és poliklonális ellenanyagok 27

2. ANYAG ÉS MÓDSZER 31

2.1. Tápfolyadékok és a kiegészítésükre használt anyagok, pufferek és egyéb anyagok 31

2.2. A kísérletekben felhasznált állatok, sejtvonalak, vírusok 34

2.3. Monoklonális ellenanyagok előállítása 35

2.3.1. Az immunizálások 35

2.3.2. Sejtfúziók 36

2.3.3. A hybridomák tenyésztése 37

2.3.4. A sejtek lefagyasztása, tárolása és feolvasztása 37

2.3.5. Klónozások 38

2.3.6. Ascites termelés 38

2.4. Monoklonális ellenanyagok tesztelése 38

2.5. Immunglobulinok tisztítása (NH4)2SO4-os precipitációval 41

2.6. Affinitás-kromatográfiás oszlop készítése 41

2.7. Affinitás-kromatográfia monoklonális ellenanyaggal 42

2.8. Sejtszuszpenziók készítése 43

2.8.1. Leukocyták baromfi perifériás vérből 43

2.8.2. Granulocyta frakció tisztítása 43

2.8.3. Csirke perifériás vér adherens sejtjeinek tisztítása 44

2.8.4. Sejtszuszpenziók készítése lépből, thymusból és Bursa Fabriciiből 44

2.8.5. Peritoneális exudátum sejtek indukálása és preparálása csirkéből 45

2.9. Csirke leukocyták funkcionális vizsgálata 45

2.9.1. Kezelések monoklonális ellenanyagokkal 45

2.9.2. Csirkesejtek kezelése tripszinnel 46

2.10. Cytotoxicitási reakciók mérése 46

2.10.1. Természetes cytotoxicitási reakció (NK) 46

2.10.2. Ellenanyagdependens sejtközvetítette cytotoxicitás (ADCC) 47

2.10.3. A cytotoxicitási reakciók kiértékelése 47

2.11. Az interferontermelés indukciója csirkesejtekben 48

2.12. Csirke leukocytainterferon titrálása 48

2.13. Nemspecifikus észteráz festés 49

2.14. EA-rozetta képzés csirke leukocytákkal 49

3. Eredmények 51

3.1. Humán α-interferonnal reagáló monoklonális ellenanyagok 51

3.1.1. Előállítás és tesztelés 51

3.1.2. Az α-interferon ellen termelt monoklonális ellenanyagok interferont neutralizáló aktivitása 53

3.1.3. A human α-D szubtípusú interferont neutralizáló aktivitás hiánya 58

3.1.4. A recombináns humán α-interferonnal reagáló monoklonális ellenanyagok szubtípusainak meghatározása 59

3.1.5. Interferon tisztítás affinitás kromatográfiával 59

3.2. Csirkesejtekkel reagáló monoklonális ellenanyagok előállítása 61

3.2.1. Fúziók tisztított granulocytákkal immunizált egerek lépsejtjeivel és a hybridomák izolálása 62

3.2.2. Fúziók Bursa Fabricii eredetű sejtekkel immunizált egerek lépsejtjeivel és a hybridomák izolálása 63

3.2.3. A csirkesejtekkel reagáló ellenanyagokat termelő hybridomák tesztelése. 64

3.2.4. Funkcionális vizsgálatok csirkesejtekkel reagáló monoklonális ellenanyagokkal 77

3.2.4.1. Ellenanyagaink hatása a csirke leukocyták természetes cytotoxikus aktivitására 78

3.2.4.2. Az ellenanyagfüggő sejtközvetítette cytotoxicitási reakció gátlása monoklonális ellenanyagokkal 82

3.2.5. Az IC3 ellenyag jellemzése 88

3.2.5.1. Ellenanyagaink EA rozetta képződést gátló hatása. 90

3.2.5.2. A tripszinnel kezelt csirke granulocyták nem reagálnak az IC3 monoklonális ellenanyaggal 93

3.2.5.3. Az IC3 ellenanyag hatása az effektor-target összekapcsolódására az NK reakcióban 94

3.2.6. A monoklonális ellenanyagaink hatása a csirke leukocyták vírus indukálta interferon termelésére 95

3.2.7. A 2B1 jelű monoklonális ellenanyag jellemzése 96

3.2.7.1. A 2B1 monoklonális ellenanyag + C' kezelés hatása a Jerne-féle haemolitikus plakkot képző (immunglobulin termelő) sejtekre 98

3.2.7.2. A 2B1 monoklonális ellenanyag és complement kezelés hatása a nemspecifikus észtáráz pozitiv sejtekre 98

4. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE 103

4.1. Monoklonális ellenanyagok recombináns humán α-interferon ellen 103

4.2. Csirkesejtekkel reagáló monoklonális ellenanyagok 106

4.3. Az ellenanyagok hatása a csirkeleukocyták spontán cytotoxicitására 111

4.4. Monoklonális ellenanyagaink hatása a csirke leukocyták vírusindukálta interferontermelésére 114

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 117

6. IRODALOMJEGYZÉK 118

1. BEVEZETÉS

1.1. Monoklonális ellenanyagok

Köhler és *Milstein* 1975-ben a monoklonális ellenanyagok előállítását lehetővé tevő hybridoma technika kifejlesztésével az immunológusok egyik legfontosabb célját valósították meg: homogén ellenanyagok termelése - nagy mennyiségben - a legkülönfélébb antigénekkel szemben (*Köhler* és *Milstein*, 1975). Homogén ellenanyagok nyerése a szomatikus sejthybridek előállítása előtt is lehetséges volt: myeloma multiplex (plasmocytoma) sejtek gyakorlatilag monoklonális ellenanyagot termelő tumorok. Azonban ezeknek az ellenanyagoknak a specificitása nem volt befolyásolható, csak esetleg utólag meghatározható.

Ezt a hátrányt próbálták legyőzni akkor, amikor immunizált humán perifériás vérből származó lymphoid sejteket transzformáltak, és így egy olyan sejtvonalat kaptak, amely folyamatosan termelte az ellenanyagot az antigénnel szemben (*Baumal* és mtsai., 1971).

Sejtek fúziója spontán is végbemehet, azonban igen kis gyakorisággal: $1/10^6$ - 10^7 sejt. Ezek a vizsgálatok vezettek el ahhoz a megfigyeléshez, hogy hogyan történik az immunglobulin gének expressziójának regulációja. Kimutatták, hogy hybridek képződhetnek különböző egér-myeloma sejtek fúziójakor, továbbá megfigyelték a hybridek immunglobulin génjeinek kodomináns expresszióját, valamint egyes kromoszómáik szelektiv elvesztését is (*Margulies* és mtsai., 1976).

Ahhoz, hogy a hybridoma sejteket szelektíven tudjuk tenyészteni, megfelelő szelekciós rendszer szükséges, hogy meggátoljuk a fúzióhoz használt myeloma sejtek szaporodását. A

klasszikus biokémiai szelekciós módszer a HGPRT (hypoxantin guanosin-phosphoribosil-transferase) hiányos, vagy TK (timidin-kinase) hiányos tumor sejtek használatán alapul (*Littlefield*, 1964). Ezen enzimeknek hiányában a sejtek elpusztulnak a hypoxantin-aminopterin-timidin (HAT) tartalmú tápfolyadékban.

A sejtfúziók gyakoriságának növelése is az egyik fontos célkitűzése volt a kísérleteknek. Polietilén-glikollal a fúziók gyakoriságát 2-10 szeresére lehetett fokozni. Ez körülbelül 500 hybridomát jelent egy lépre számolva (*Köhler* és *Milstein*, 1975).

Problémát jelentett az is, hogy az immunglobulinok szekréciója kodomináns, vagyis a myeloma által szekretált immunglobulinok is megmaradnak a fúzió után, sőt az egyes immunglobulin láncok recombinációja a lépsejt által szekretált immunglobulin láncokkal is megfigyelhető. Ezért olyan myeloma sejtvonalakat alakítottak ki, amelyek sem immunglobulin molekulákat, sem az immunglobulin molekula alegységeit nem szekretálják.

A monoklonális ellenanyagoknak számos előnyös tulajdonságuk van a poliklonális ellenanyagokkal szemben:

- Szigorúan homogén ellenanyag-molekula populációt alkotnak, az antigénmolekula egyetlen epitópjával reagálnak.
- Használatuk előtt nem kell specificitást növelő abszorbciót végezni.
- Magas titerben előállíthatók, mivel a hybridoma sejtek ascites formában is növeszthetők.
- A hybridoma sejtek folyamatos növekedése folytán gyakorlatilag korlátlan mennyiségben előállíthatók.
- Minőségük, specificitásuk gyakorlatilag nem változik, ellentétben a poliklonális ellenanyagokkal, amelyek teljes-

ségükben nem reprodukálhatók egy másik egyed oltását követően: minden immunizálás más és más összetételű, heterogén ellenanyag populációt hoz létre.

Azonban a monoklonális ellenanyagok termelésében is számos nehézség fordulhat elő:

- A fúziót követően a kapott hybridomák tesztelése igen munkaigényes és megfelelő érzékenységü, gyorsan végrehajtható módszert igényel.

- A hybridoma elveszthetí ellenanyag szekretáló képességét, aminek több oka is lehet:

  - A nem-szekretáló klónok szelekciós előnyben lehetnek és fokozatosan dominánssá válnak a hybridoma-populációban.

  - Előfordulhat genetikai instabilitás, ami kromoszómavesztéssel járhat (*Hadas* és mtsai., 1987).

További nehézségek léphetnek fel a felhasználás során is:

- A monoklonális ellenanyagokat gyakran nem lehet közvetlenül immunprecipitációs, agglutinációs módszerekben alkalmazni.

Annak ellenére, hogy a monoklonális ellenanyagok előállítása igen munkaigényes és viszonylag költséges, előnyei miatt ma már mégis igen sokféle antigén ellen fejlesztettek ki monoklonális ellenanyagot.

Ezek az antigének - egy féle csoportosítás szerint - lehetnek sejtfelszínhez kötött, illetve szolubilis formában levő molekulák.

1.1.1. Monoklonális ellenanyagok szolubilis antigénekkel szemben

Immunogenitás szempontjából legjobb antigének a fehérje molekulák (*Todd* és mtsai., 1982). Egyetlen fehérje molekulán igen sokféle antigéndeterminánsok lehet. Ezek vagy egyediek, vagy ismétlődők egyetlen molekulán belül. Az immunizálás során párhuzamosan számos antigéndeterminánsok ellen képződnek ellenanyag molekulák, a poliklonális szérum ezeknek az ellenanyag molekuláknak a keveréke. Ezzel szemben, egy monoklonális ellenanyag csakis egyetlen fajta immunglobulin molekulát tartalmaz, amely általában nagy affinitással reagál egy(fajta) antigéndeterminánsok csoporttal (specifikus). Egyetlen fehérjemolekula ellen többféle monoklonális ellenanyag készíthető, melyek segítségével feltérképezhetők az antigén molekulán lévő antigéndeterminánsok csoportok.

Természetesen nem csak fehérje molekulák, hanem poliszacharidok, lipidek, nukleinsavak ellen is készíthetők monoklonális ellenanyagok, sőt olyan kis molekulasúlyú vegyületek ellen is (ún. haptének), amelyek önmagukban nem immunogének, de valamilyen hordozóhoz kötve specifikus ellenanyagok képződését váltják ki.

Monoklonális ellenanyagok interferonnal szemben

Az interferonmolekulák igen nagy biológiai aktivitással rendelkező proteinek, illetve glikoproteinek. Három fő tipusuk van: - Leukocyták (nagy, granulált lymphocyták (LGL), B sejtek, macrophagok) által, virus indukciót követően termelődő alfa interferon (α-IFN).

- Leukocyták (T sejtek) által, mitogén, vagy antigén indukció hatására termelődő gamma interferon (τ-IFN).

- Fibroblastok által, virus indukciót követően termelődő béta interferon (β-IFN).

Az interferonok sokféle módon hatnak az immunrendszerre: antivirális hatásúak, gátolják a sejtosztódást, befolyásolják a humorális és a sejtes immunválaszt, hatnak a sejtfelszíni markerek megjelenésére (*Friedmann* és mtsai., 1983).

Ma már egér, patkány és humán eredetü interferonok ellen több kutatócsoport állitott elő monoklonális ellenanyagokat (*Hochkeppel* és mtsai., 1981a; *Hochkeppel* és mtsai., 1981b; *Prat* és mtsai., 1984; *Bosveld* és mtsai., 1982; *Meager* és mtsai., 1984; *Novick* és mtsai., 1982; *Berg* és mtsai., 1984; *Le* és mtsai., 1984a; *Le* és mtsai., 1984b; *Sano* és mtsai., 1983; *Whittal* és mtsai., 1984; *Osheroff* és mtsai., 1984; *Gribaudo* és mtsai., 1985).

A természetes interferon ellen monoklonális ellenanyagot termelő hybridomák kiválogatásához az anti-interferon aktivitást biológiai tesztekben határozták meg a vírusok cytopátiás hatását kivédő aktivitás felfüggesztése (az interferon hatás gátlása) alapján (*Novick* és mtsai., 1982; *Hochkeppel* és mtsai., 1981a,b), vagy az interferon ellenanyaggal történő precipitációja és ezt követően aktivitásának visszamérése alapján (*Novick* és mtsai., 1982). Ugyancsak alkalmasnak bizonyult az ellenanyag szilárd fázishoz való kötése, majd ezzel az interferont tartalmazó minta kimerítése és ezután a maradék, nem kötődött interferon aktivitásának a meghatározása (*Berg*, 1984). Természetes interferonnal az enzim vagy radio-immonoassay kivitelezése nehézségekbe ütközik: a természetes interferon teljes tisztítása nem megoldott, és így nehéz előállítani megfelelő tisztaságú antigént a kísérletekhez. Ezt a nehézséget sikerült legyőzni recombináns interferon alkalmazásával:

tiszta, nagy specifikus aktivitású interferon preparátumokat állítottak elő. Ezek már alkalmasak voltak az állatok immunizálására és enzim- vagy radio-immunoassay-vel tesztelhették a hybridomák felülúszóinak anti-interferon aktivitását (*Osheroff* és mtsai., 1984; *Le* és mtsai., 1984a). A recombináns interferonmolekulák ellen készített monoklonális ellenanyagok azonban nem minden esetben reagálnak az azonos típusú természetes interferonnal (*Le* és mtsai., 1984a).

Az interferonok ellen termelt monoklonális ellenanyagokat több célra is felhasználhatók: az interferon affinitáskromatográfiás tisztítására (*Novick* és mtsai., 1982), a mintában lévő interferon mennyiségének a meghatározására, a neutralizáló hatású ellenanyagokkal az interferon hatásának felfüggesztésére kísérletes körülmények között, a különféle biológiai folyamatokban képződő interferon kimutatására, az interferon molekula antigén determináns csoportjainak a feltérképezésére (*Meager* és mtsai., 1986).

1.1.2. Monoklonális ellenanyagok sejtfelszíni antigénekkel szemben

Egyetlen sejt felszínén nagyon sokféle struktúrájú és funkciójú molekula található. Ha ezek ellen akarunk monoklonális ellenanyagot készíteni, akkor vagy magával a sejttel, vagy pedig a tisztított antigénnel immunizálhatunk. Az első lehetőség egyszerűbben kivitelezhetőnek látszik. De ebben az esetben a tesztelés nehezebb: utólag kell azonosítani a sejten az ellenanyaggal reagáló struktúrát, illetve az immunizáláshoz használt sejtpopuláció homogenitását - azaz a kiválasztott antigének optimális mennyiségét - meglehetősen nehéz biztosí-

tani. Nem ritka az sem, hogy egy monoklonális ellenanyag az adott antigén többféle sejten való előfordulása miatt, különböző sejtféleségekhez kötődik, és így igen munkaigényes a kívánt specificitású monoklonális ellenanyag előállítása.

A sejtfelszíni antigénekkel reagáló ellenanyagok tesztelésére, kiválogatására, jellemzésére sokféle lehetőség kínálkozik. Például complement függő cytotoxicitási tesztben - festékkizárásos, vagy ^{51}Cr-izotóp release teszttel - meghatározhatjuk, hogy a vizsgált sejtek hány százaléka reagál az ellenanyaggal.

Az ellenanyaggal reagáló sejtek százalékos megoszlását meghatározhatjuk indirekt immunofloureszcenciás teszttel, illetve ma már igen sok helyen automatizálták ezt a munkát a cytofluorométer (FACS) alkalmazásával.

A sejtes enzim-immunoassay, vagy radio-immunoassay pedig arról ad felvilágosítást, hogy a vizsgált sejtek egyáltalán reagálnak-e a kérdéses ellenanyaggal.

A monoklonális ellenanyaggal reagáló sejtfelszíni antigénmolekula típusát, molekulasúlyát is meghatározhatjuk: a radioaktív izotóppal jelölt sejtek szolubilizálását és az antigén ellenanyaggal történő precipitálását követően SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel meghatározható a vizsgált anyag molekulasúlya.

Mostanra már - többek között - humán, egér, patkány és csirkesejtek ellen is készítettek monoklonális ellenanyagokat. Ezek között igen jelentősek azok, amelyek a szervezet immunrendszeréhez tartozó sejtekkel reagálnak, sőt, több ellenanyag diagnosztikai, illetve terápiás célra is alkalmasnak bizonyult. Ezeknek az ellenanyagoknak fontos szerepük van az egyes sejtpopulációk elkülönítésében, illetve annak a felderítésében,

hogy bizonyos biológiai funkciók mely sejtpopulációk mûködéséhez kötöttek. Ellenanyaggal és complementtel eliminálni tudjuk a kérdéses ellenanyaggal reagáló sejteket, így ezek mûködésének a megszünése a megfelelő funkcionális vizsgálatokkal detektálható. Arra is lehetőség van, hogy az ellenanyaggal reagáló sejtpopulációt megtisztítsuk, elkülönítsük a többitől és ezek funkcióját izoláltan vizsgáljuk. Egyik ilyen - egyszerübb - módszer a "panning" technika, amikor az ellenanyagot szilárd hordozóhoz kapcsoljuk és az ellenyagokkal mintegy lehorgonyozzuk a velük reagáló sejteket. A nem kötődött sejtek pedig mosással eltávolíthatók (*Wysocki* és mtsai., 1978). Egy másik lehetőség a cytoflourométerrel (FACS, EPICS) történő sejtszeparálás. Ekkor a sejtek méretük, szemcsézettségük, vagy ellenanyaggal való kötődésük alapján válogathathatók szét.

1.2. A szárnyasok immunrendszerének sajátosságai

A szárnyasok az immunbiológiai kutatások számára több szempontból is igen előnyös alanyok:

- Az embrió az anyától izoláltan fejlődik és így lehetőség van számos olyan kísérleti beavatkozásra, amelyeket emlős magzatokon nem, vagy csak nagy nehézségek árán lehet elvégezni.

- A *Bursa Fabricii*, azaz egy anatómiailag különálló B sejt forrásnak a megléte, amely megkönnyíti a B sejtes kompartment, a humorális és a celluláris immunfunkciók különálló vizsgálatát.

A tojásban fejlődő emriót nem-immunológiai tényezők, a tojáshéj, a héjmembrán és a tojásban levő albumin frakció - li-

zozim és avidin tartalmánál fogva erős alkiláló és germicid hatású anyagok - védi a külső fertőzésektől. Bár az interferon termelődése chorioallantois membrán fragmentumok vírussal *in vitro* való fertőzését követően már a 6 napos embrióból kimutatható, ennek ellenére a tojás fogékonysága a fertőzések iránt a 10-15 napok között a legnagyobb (*Seto*, 1981). Az egyre növekvő extraembrionális membrán ekkor kerül kapcsolatba a héjmembránnal (*Seto*, 1981). Később, az embrió immunrendszerének kialakulásával, fokozatos érésével ez a fogékonyság csökken.

Ebben a szakaszban leginkább az embrionális retikuloendotheliális rendszer (RES) sejtjei vesznek részt az immunológiai védelemben: szabad és kötött macrophagok, de az embrióban levő interferonnak, complementnek és anyai eredetü opszoninoknak is fontos szerepük van. Az embrionális fejlődés során a lymphopoetikus őssejtek elsődleges forrásának ma már inkább az embrionális máját, mintsem a csontvelőt tekintjük (*Aitken*, 1975). Már az embrionális élet első hete után leukocyták mutathatók ki a magzati keringésből (*Lemez*, 1979). Az embrionális élet második felében az addig diffúzan eloszló, phagocyta funkcióval rendelkező sejtek fokozatosan koncentrálódnak a RES immár véglegesen kialakuló fő csomópontjaiban: a májban, a lépben, a tüdőben, csontvelőben stb. Az immunrendszer anatómialiag a későbbiekben is viszonylag diffúz rendszert alkot, azonban egyes elemei minden "stratégiailag fontos" helyen megtalálhatók. A szárnyasok primér, azaz centrális nyirokszervei, tehát azok a szervek amelyekben az őssejtek telepednek meg és amelyek biztosítják a sejt-utánpótlást a perifériás (másodlagos) immunrendszer számára a következők: az emrionális szikzacskó, a thymus, a *Bursa Fabricii* és a csontvelő. A szekunder nyirokszervek

pedig a lép, a bélcsatorna falán lévő cecalis tonsillák és a szemüreg hátsó falán levő Harder féle-mirigy (*Seto*, 1981).

1.2.1. Bursa Fabricii

A Fabricius féle tömlő a madarak normális humorális immunválaszának kifejlődésében nélkülözhetettlen lymphoepitheliális szerv. Az állat kloákájának a közelében helyezkedik el. Mivel jól elhatárolódó szerv, sebészi módszerrel könnyen eltávolítható, de hormonnal, illetve kémiai anyagokkal való kezeléssel is kiirtható. Azonban hiába végeztek bursectomiát az emrionális fejlődés különböző szakaszaiban, tartós, teljesen agammaglobulinémiás állapotot nem sikerült előidézni. *Cooper* és mtsai. az inkubáció 17. napján végzett bursectomiát követően csak átmeneti plasmasejtszám csökkenést, immunglobulin és antigénspecifikus ellenanyag hiányt, illetve a lép centrum germinativumainak számbeli csökkenését tapasztalták az állatokban (*Cooper* és mtsai., 1969).

Jalhanen és mtsai. (1983) azt az eredményt kapták, hogy a keltetés 60. órájában sebészileg bursectomizált csirkékben normális morfológiájú B, illetve plasmasejtek vannak, termelődik bennük IgG, IgM, IgA. De nem képesek bizonyos specifikus ellenanyagok képzésére, nincsenek auto-ellenanyagaik, illetve természetes ellenanyagaik. Az intracytoplasmatikus IgG mennyisége normális, de a szérum IgG mennyisége csökkent, ami pedig IgG szekréciós zavart feltételez.

Lerner a bursectomia különböző módszereit alkalmazva azt találta, hogy az IgG típusú ellenanyagok mennyisége csökkent, míg az IgM típusúaké növekedett a beavatkozást követően. Ennek alapján pedig azt állította, hogy a Fabricius-féle tömlőnek az

antigén specifikus IgG típusú ellenanyagok termelődésének fokozásában lehet szerepe (*Lerner* és mtsai., 1971; *Fitzsimmons* és mtsai., 1973). Ez egyben arra is utalhat, hogy hasonlóan az egerekben vagy az emberekben megfigyelt Ly 1 illetve CD5 antigén pozitív IgM termelő B sejtjeihez a csirkékben is két, egymástól viszonylag független B sejtes rendszer létezik (*Hardy* és mtsai., 1986).

Kermani-Arab és *Leslie* szerint a sebészi bursectomia az állatokban agammaglobulinémiás állapotot hoz létre és ezek lymphoid sejtjeit normál recipiensbe transzplantálva hypo- illetve agammaglobulinémiás állapotot vált ki, ami pedig szupresszor T sejtek jelenlétére utal (*Kermani-Arab* és *Leslie*, 1977). A bursectomizált csirkék antigéningerekre mutatott specifikus válaszképtelenségét azonban irradiált, hisztokompatibilis csirkékbe csontvelősejtekkel nem sikerült átvinni. Így azt a hipotézist, hogy a válaszképtelenséget szupresszor T sejtek okozhatják, nem sikerült bizonyítani (*Veromaa* és mtsai., 1986).

Egy igen érdekes tulajdonsága a Fabricius-féle tömlőnek, hogy a kloákán keresztül az antigén közvetlenül érintkezésbe kerülhet vele: a thymus independens antigének, amelyek az ellenanyag termelődés megindulásához nem igényelnek T-B sejt kooperációt, *per bursam* juttatva az állatba, a szérumban jól mérhető, magas titerű ellenanyagválaszt indukálnak (*Sorvari* és mtsai., 1975).

A Fabricius-féle tömlő az állatok egyedfejlődése során idősebb korban atrophiássá válik, ezért sejtjeinek izolálására csak fiatal, néhány hetes állatokat lehet felhasználni.

1.2.2. A thymus

A csirkék thymusa 14 lebenyből áll, amelyekből 7-7 helyezkedik el a nyak két oldalán a venae jugulares mellett. Maximális méretét a fejlődés 4. hónapjában éri el, majd a nemi érést követően fokozatosan visszafejlődik. A thymus lymphocytái kisebbek, mint a Fabricius-féle tömlőben találhatók és nem mutatnak olyan nagy méretbeli változatosságot. A T és B sejtek scanning elektronmikroszkóppal vizsgálva egyformák, a sejtek 95%-a - függetlenül származási helyétől - sima felszínü.

A T és B sejtek egymástól való elkülönítése sejtfelszíni markereik alapján lehetséges: a Fabricius-féle tömlő sejtjeinek felszínén immunglobulinokat lehet kimutatni, míg a thymussejtek felszínén ezek hiányoznak.

A thymusban a lymphocyták mellett kis számban eosinophyl, basophyl és heterophyl granulocyták, valamint macrophagok is vannak.

A thymus - amellett, hogy elsődleges forrása a sejtközvetített immunfolyamatokért felelős T sejteknek - B sejteket is tartalmaz. Ezek a B sejtek az intravénásan, vagy közvetlenül a thymusba adott antigénre ellenanyag termeléssel válaszolnak (*Kendal*, 1980).

A thymectomia sebészi módszerrel és kémiai kezeléssel egyaránt végezhető. Thymus-irtott állatban a DTH reakció gátolt, az allogén bőr transzplantátumok kilökődésének ideje azonban nem változik. Ezzel szemben, más kutatók bebizonyították a thymussejtek szerepét a bőrgraftok kilökődésében. Ezekben a kísérletekben azonban fontos volt, hogy milyen idős állatokon végezték a thymectomiát. A thymus ezenkívül, mint endokrin mirígy, hormonok termelésben is részt vesz (*Kendall*, 1980).

1.2.3. A lép

A lépkezdemény az egyedfejlődés 4. napján jelenik meg, a 11. naptól kezdve pedig intenzív erithro-granulocytopoézis folyik benne. Myeloid jellegét egészen a kikelésig megőrzi. Ekkor válik lymphoid szervvé, a lympho- és monocytaképződés fő helyévé.

A csirke lépsejtjei - hasonlóan az emlősökéhez - nylon rostokhoz történő adherencia alapján két csoportba oszthatók (*Lamont* és *van Alten*, 1981):

-Nem adherens, T sejtben feldúsult populáció, melynek sejtjei a T sejt mitogén PHA és Con A hatására erőteljesen osztódni kezdenek.

-Nylon adherens, 50%-ban sejtfelszíni Ig-t hordozó B sejtekben feldúsult frakció. Ezek között a sejtek között igen sok ellenanyagtermelő sejt is van, továbbá ezek a sejtek T sejt mitogénekkel gyengén stimulálhatók. A PWM-re adott válasz pedig mindkét izolált sejtpopulációban alacsonyabb volt, mint a nem szeparált lépsejtek esetében.

Mint ahogy *Vanio* és *Ratcliffe* (*Vanio* és *Ratcliffe*, 1984) kimutatták, a PWM csirkékben is adherens sejt - valószínüleg macrophag - dependens T és B sejt mitogén. Fc receptorral rendelkező sejtek mind a nylon adherens, mind a nem adherens sejtek között vannak és ezek nagy része (60-80%-a) macrophag.

A csirkék lépében lévő úgynevezett elipszoidhoz asszociált sejtek nagy valószinüséggel dendritikus sejtek, amelyek igen fontos szerepet játszanak az antigének prezentálásában. Ezek a sejtek endocytozissal különböző részecskéket, például szénszemcséket, immunogén fehérjéket, például bovin szérumalbumint, tormaperoxidázt képesek felvenni. Ezt követően a sejtek elvándorolnak a fehérpulpából a vöröspulpába, majd valószínüleg

a sinusokba és a keringésbe kerülnek. Tormaperoxidáz intravénásan történő beoltását követően 5 órával erőteljes dendritikussejt depléció figyelhető meg az elipszoidok körül és a vérben nagymennyiségü, tormaperoxidáz pozitiv, monocyta morphologiájú sejt jelenik meg (*Oláh* és mtsai., 1984).

1.2.4. Harder féle mirigy

Ez a mirigy a szemüreg belsejében található. Acinusai a pislogóhártya és a cornea nedvesítésére szolgáló nyálkás váladékot termelik. Az acinusok közötti részben háromhetes korban sok plasmasejt jelenik meg. A legtöbb plasmasejt felszínén G, A, és M típusú immunglobulinok vannak. Kilenchetes kortól pedig az IgA típus válik uralkodóvá. Míg a helyileg adott antigén stimulálja a sejteket, addig az intravénásan adott nem (*Mueller* és mtsai., 1971). Ezek alapján feltételezik, hogy a Harder-mirigy helyi ellenanyagforrásként szerepel a légutakat megtámadó kórokozók belépési helyéül szolgáló oculonasalis régióban. A mirigy anatómiai helyzete kizárja sebészi eltávolítását, de funkcionális gátlása a mirigy kivezető nyílásának elzárásával előidézhető.

1.2.5. A szárnyasok humorális immunválasza

A humorális immunválasz effektorsejtjei szárnyasokban is a B, illetve a plasmasejtek. A szárnyasok szekretoros ellenanyagai három osztályba sorolhatók: IgG, IgM és IgA. Az immunglobulinok fizikai és kémiai tulajdonságaikat tekintve különböznek az emlősökéitől. Míg az emlős immunglobulint tartalmazó

immunkomplexek képesek mind az emlősök, mind a szárnyasok complementrendszerének aktiválására, addig a csirkeimmunglobulint tartalmazók csak a csirke eredetű complement aktiválására alkalmasak. Ezzel függ össze az is, hogy a csirkesejteken lévő Fc receptorok nem képeznek EA rozettát az emlős haemolysinnel kezelt birka vörösvértestekkel (*Wick* és mtsai., 1982).

Az ellenanyagválasz a csirkékben is - az emlősökhöz hasonlóan - az antigéntől függően, lehet T sejt dependens (TD), illetve T sejt independens (TI). A TD választ az immunizált állat lépsejtjeivel át lehet vinni immunológiailag inkompetens recipiensbe, míg Fabricius-féle tömlőből származó sejtekkel nem (ilyen antigén például a birkavörösvértest). Ezzel szemben a TI antigénekre (például *Brucella abortus*) adott ellenanyag válasz *Bursa Fabricii* eredetű sejtekkel is átvihető. A thymectomizált és irradiált csirke a TD antigének hatására csak csökkent mértékben termel ellenanyagot, tehát a csirkében is szükség van a thymusra a B sejtek normális ontogenezisséhez. A TNP-Ficollra (TI antigén) adott ellenanyagválasz relative thymus independens (*Edelman* és mtsai., 1985).

A csirke B sejtek antigén felismerő receptorai is immunglobulin molekulák. Madarakban a Fabricius-féle tömlő follikulusaiban már az embrionális fejlődés 18. napján sejtfelszíni IgM-et hordozó pre-B sejtek vannak, illetve a felnőtt állatok pre-B sejtjei is sejtfelszini IgM-t hordoznak (*Eerola*, 1983).

1.2.6. A sejtes immunválasz

A csirke perifériás vér sejtjeinek száma, egymáshoz viszonyított aránya nagy mértékben különbözik az emlősökben tapasztaltaktól. Egy festett vérkeneten rögtön szembetünnek a

nagy, magvas vörösvérsejtek, és az ugyancsak sejtmaggal rendelkező thrombocyták. A csirkék leukocytáinak - az emlősökkel ellentétben - csak kissebb hányadát alkotják a heterophyl granulocyták. Az egyes sejtek mennyisége és aránya igen tág határok között változik a fajta, a kor és a nem függvényében. Tájékoztató jelleggel az általában előforduló értékeket az 1.1. táblázatban foglaltuk össze. A lymphocyták 35%-a B, 60%-a T és 5%-a nullsejt a csirke perifériás vérében.

Csirkékből származó antigénspecifikus T sejtvonalak, hasonlóan a rágcsálók, illetve a humán T sejtekhez, *in vitro* is fenntarthatók. *Bhogal* és mtsai. (1986) T lymphocyta klónokat állítottak elő a csirkék coccidiosisát okozó *Eimeria tenella* protozoonnal immunizált állatok lépsejtjeiből. Ezeket a klónokat 12-14 hétig tartották fenn *in vitro* a parazita antigénjeit, antigént prezentáló sejteket és csirke T sejt növekedési faktort tartalmazó tápfolyadékban. Ezeknek a T sejt klónoknak az antigénspecifikus proliferációjához hisztokompatibilis antigénprezentáló sejtek szükségesek, hasonlóan az egér és humán sejtklónoknál tapasztaltakhoz. A kapott T sejt klónok között voltak antigéndependens helper, valamint szupresszor hatású sejtek, illetve olyanok is, amelyek a macrophagok sporozoita ellenes aktivitását fokozó lymphokineket termeltek.

1.2.7. A lymphoid sejtek kooperációja a szárnyasok immunrendszerében

A csirkékben, hasonlóan az emlősökben megfigyeltekhez, igen bonyolult, nagyon sokféle sejttípus kölcsönhatását feltételező immunológiai reakciókat lehet megfigyelni. A T és B

1.1. táblázat.

A csirkék perifériás vérében előforduló főbb sejttípusok %-os megoszlása.

Sejttípus	%	Sejt/mm^3
Lymphocyta	64-76	10-22000
Monocyta	5,7-6,4	1000-1600
Heterophilek	13-26	4000
Eosinophilek	1-2,5	250-700
Basophilek	2,4	400-700

sejtek együttműködéséről már a humorális immunválasz leírása során is említést tettem, amikor is a T-dependens és T-independens antigénekre adott ellenanyagválaszt jellemeztem (*Edelman* és mtsai. 1985).

A késleltetett hiperszenzitivitási reakció (DTH) csirkékben az emlősökéhez hasonló. A komplett Freud adjuvánsban adott megfelelő antigén (pl. bovin szérumalbumin, BSA) jó DTH választ eredményez. A BSA által kiváltott DTH reakció során helper funkciójú T sejtek mutathatók ki az állat lépében. Humán gammaglobulint intravénásan adva, az állatokban toleranciát tudtak kiváltani ezzel az antigénnel szemben. A toleranciát ebben az esetben a T helper sejtek depléciója, nem pedig T szupresszor sejtek okozták (*Grebenau* és mtsai., 1979).

Az első graft-versus-host szerű reakciót csirkékben sikerült megfigyelni: felnőtt állatokból származó perifériás leukocyták embrióba oltása lépmegnagyobbodást indukál. Ekkor ugyanis az embrionális tasakból származó őssejtek erőteljes

proliferációja indul meg az allogén eredetű sejtek hatására (*Murphy*, 1916).

Kéthetes állatokban is sikerült GVH reakciót kiváltani: ha az irradiált recipiensbe felnőtt állatból származó, allogén lépsejteket jutattak, fokozódott a tríciummal jelölt timidin felvétele a recipiens lépében az oltást követő 4. napon. Ha Mitomicin C-vel, vagy anti-T-savóval és complementtel kezelt lépsejteket oltottak be a recipiensekbe, akkor ilyen jelenséget nem tapasztaltak. Viszont, ha nem-irradiált, de anti-T savóval T sejt depletált recipiensbe Mitomycin C-vel vagy anti-T-savóval és complementtel kezelt donor T sejteket juttattak, ugyancsak fokozott tríciummal jelölt timidin-beépülést tapasztaltak a recipiens lépsejtjeiben. Ez pedig arra utal, hogy a nem-T sejtek proliferációja következik be a kezelt donor sejtek hatására a recipiens lépében. (*Nisbet* és mtsai., 1969).

A GVH reakció csirkékben tehát igen hasonló a rágcsálókban megfigyelthez: a donor immunológiailag aktív T sejtei szükségesek ahhoz, hogy a recipiensek bizonyos nem-T-sejt populációi aktiválódjanak.

A tumor elleni immunológiai védekezésben fontosak a T sejtek és a monocyták közötti kölcsönhatások. Ha hisztokompatibilis, transzpantálható tumorsejteket jutattak be egy csirkébe és emellett valamilyen bakteriális adjuvánssal kezelték az állatot, tumorspecifikus immunitás fejlődött ki a recipiensben. Az immunitásért felelős sejtekről megállapitották, hogy Mitomycin C rezisztens, gamma-sugárzással szemben érzékeny T sejtek (*Palladino* és *Thorbeck*, 1978a). Mivel a tumorral szemben immunizált állatok az irradiált tumor sejtek bejutattására DTH reakcióval válaszolnak, igy ebben a folyamatban minden bizonnyal helper T sejtek is részt vesznek. A különböző monocyta elimi-

SZTE Bényelemi Könyvtár SZEGED 14.

náló eljárások hatására viszont (tripánkék, vagy szilika kezelés, besugárzás) a csirke elveszti a tumorellenes immunitását (*Palladino* és *Thorbeck*, 1978b).

1.2.8. A természetes sejtközvetítette cytotoxicitás csirkékben

Ebben a folyamatban egy, előzetesen nem immunizált szervezet sejtjei képesek bizonyos sejteket elpusztítani. Az ilyen cytotoxicitási mechanizmusban MHC-restrikció nincs. A reakcióban résztvevő sejtek meglehetősen heterogének. A reakció maga alapvetően két fő típusra osztható:

- Az NK, vagy természetes cytotoxikus reakció.
- Az ellenanyagfüggő sejtközvetítte cytotoxicitás (ADCC).

Emlősökben az NK aktivitás 90%-áért a nagy, granulált lymphocyták, az LGL sejtek a felelősek. A monocyták és a macrophagok is aktívak lehetnek megfelelő körülmények között. ADCC aktivitásuk - hasonlóan az NK-aktivitáshoz - az LGL sejteknek, monocytáknak, macrophagoknak és a granolocytáknak van. Az ADCC reakcióban a targetsejtekhez előzetesen *in vitro*, vagy *in vivo* ellenanyagok kapcsolódnak mintegy hidat képezve az effektor és a target sejtek között. Az ADCC reakcióban résztvevő effektorsejteknek tehát közös tulajdonsága a felületükön lévő Fc receptor, mellyel az ellenanyag-fedett targetsejtekhez kötődnek és azt követően elpusztítják azokat (*Roit*, 1988).

Az NK reakcióban valamilyen más, eddig még nem azonosított sejtfelszíni struktúra játszhat szerepet a target és az effektor sejtek összekapcsolásában.

Szárnyasokban is kimutattak természetes cytotoxikus sejteket, de ennek irodalma az emlős rendszeréhez viszonyítva

sokkal kisebb. Csirke lépsejtek cytotoxikus aktivitását *in vitro* többféle targetsejttel szemben vizsgálták: például *Sharma* és *Okazaki* az LSCC-RP9 nevü, lymphoblastoid, RAV-2 virussal fertőzött csirke *Bursa Fabricii* eredetü tumorából származó sejtvonalat találták megfelelőnek. Azt is bebizonyitották, hogy a cytotoxicitás nem a vírusantigénnel szemben lép fel, illetve az effektorsejtek nem T sejt eredetüek és az anti-B sejt savó sem befolyásolja cytotoxikus aktivitásukat (*Sharma* és *Okazaki*, 1981).

A csirke fehérvérsejtek ADCC reakciója csak csirke immunglobulinnal fedett targetsejtek ellen játszódhat le, ami az előzőekben említett emlős és csirke ellenanyagok közötti különbség következménye.

Intézetünkben sikerült elősör azonositani a szárnyasok ADCC, illetve NK aktivitásában szerepet játszó effektor sejteket. *Béládi* és mtsai. kimutatták, hogy a csirke monocyták, granulocyták és LGL sejtek ADCC aktivitással rendelkeznek. Legnagyobb ADCC aktivitású sejteknek a granulocyták bizonyultak, ezt követték az LGL sejtek és legkevésbé aktivak a monocyták voltak. Humán adenovírus (6-os tipusú) fertőzés hatására az ADCC aktivitás jelentősen fokozódik (*Béládi* és mtsai., 1984).

A csirkesejtek ADCC aktivitását csirkeinterferonnal is fokozni lehetett. Tehát mind az adenovirus-6, mind a csirke interferon hatásos ADCC aktivitás fokozó anyagok (*Béládi* és mtsai., 1984; *Mándi* és mtsai., 1984; *Mándi* és mtsai., 1987b). Az NK sejtek azonosításához Percoll sürüséggrádiensen tisztitott csirke perifériás vér sejtfrakciókat használtak: kétfázisú Percoll grádiensen elválasztották a mononucleáris sejteket valamint a granulocytákat. A mononucleáris sejtekből további

tisztítással (adherens sejtek eltávolítása, Percoll sűrűség-grádiens centrifugálás) LGL sejtekben feldúsított sejtfrakciót nyertek. NK aktivitást csak a granulocyta frakcióban sikerült kimutatni. Sem az LGL sejtek, sem a többi mononucleáris sejt nem volt cytotoxikus az LSCC-H32 fibroblastoid, illetve az LSCC-RP9 lymphoblastoid sejtvonallal szemben (*Mándi* és mtsai., 1985).

1.2.9. A szárnyasok thrombocytái

A szárnyasok thrombocytái magvas, a kis lymphocytákhoz hasonló méretű sejtek, amelyek adherensek és phagocytálnak. Elektronmikroszkópos stuktúrájuk jellegzetes, fáziskontrasztmikroszkóppal a friss preparátumokban is elkülöníthetők, azonban fénymikroszkóppal vizsgálva nagyon hasonlítanak a kis lymphocytákhoz.

A perifériás vérből nyerhető T-, illetve a B sejtek és a thrombocyták mennyisége nagy mértékben attól függ, hogy milyen antikoagulánst, illetve tisztítási módszert használnak. *Traill* és mtsai. kimutatták, hogy a legtöbb thrombocytát tartalmazó sejtszuszpenziót akkor kapják, ha nátrium-cytrátot használnak antikoagulánsként és utána differenciál-centrifugálással izolálják a leukocytákat. Az így nyert sejtek közel 60%-a thrombocyta lesz. A thrombocyták funkciójukban inkább a macrophagokhoz, mint a lymphocytákhoz hasonlóak (*Traill* és mtsai., 1983): mitogénekkel (Con A, PHA-P, PHA-M, PWM, LPS) nem stimulálhatók. Csirkében az üvegadherens sejtek 90%-át a thrombocyták képezik, phagocytozisra képesek (*Traill* és mtsai., 1983) és érzékenyek a T és B sejtek által termelt thrombocyta migrációt gátló faktorra (*Stinson* és mtsai., 1979). A konvencionális

körülmények között, *in vitro* tenyésztés során a csirke thrombocyták száma a második nap után rohamosan csökken (*Grecchi* és mtsai., 1980).

1.2.10. Monocyták és macrophagok szárnyasokban

A csirke perifériás vérből származó üvegadherens sejtek nagyrésze thrombocyta, a fennmaradó kissebb hányada pedig monocyta és esetleg néhány lymphocytát is lehet köztük találni. Az adherens sejteket *in vitro* hosszabb ideig tenyésztve egyre szembetűnőbb a thrombocyták és monocyták közötti különbség és a 2. naptól kezdve a thrombocyták száma rohamosan csökken a tenyészetben. A 4-15 napos kultúrában egyre több lesz az úgynevezett macrophag-polykarion és egyre kevesebb a mononucleáris sejt (*Grecchi* és mtsai., 1980).

A monocytákon rövid *in vitro* tenyésztés után IgG receptorok jelennek meg, míg a thrombocytákon nem. Zimozán phagocytosisra is csak a monocyták képesek. Mind a monocytáknak, mind a thrombocytáknak C3b receptoraik vannak. A tenyésztett egér és csirke macrophagokat összehasonlítva két alapvető különbség állapítható meg:

-A csirkeeredetű macrophagok már a tenyésztés kezdetén - 18-24 óra után - átalakulnak macrophag-polykarionná, az epitheloid sejtek pedig körülbelül 5 nap múlva jelennek meg a tenyészetekben (*Sutton* és *Weiss*, 1966).

-A macrophagok és a macrophag-polykarionok is erőteljesen phagocytálják a csirke immunglobulinnal fedett birkavörösvértesteket.

Schaefer és mtsai. (1985) kimutatták, hogy a perifériás vérből származó monocyták gátolják a T sejtek mitogénekre adott válaszát.

A csirke eredetű monocyták és macrophagok - hasonlóan az emlősökéhez - nemspecifikus észteráz pozitívak. A nemspecifikus észteráz aktivitást vizsgálva a kétféle sejtpopláció között nem találtak különbséget (*Lamont* és *VanAlten*, 1981).

Egy másik, a monocytákra jellemző enzimtevékenység az endogén peroxidáz aktivitás. Ennek alapján a perifériás vér monocytái két csoportra oszthatók: *Oláh* és mtsai. szerint egyikbe a csontvelői eredetű, endogén peroxidáz pozitív monocyták, a másikba a lépből - valószínűleg antigéninger hatására kilépő és recirkuláló elipszoid-asszociált sejtek tartoznak, amelyek endogén peroxidáz negatívak. Az utóbbi sejtek - a fenn említett szerző szerint - az antigén prezentációban vesznek részt és a lépből a keringési rendszeren keresztül eljutnak a különböző lymphoid szervekbe és ott megindítják a specifikus immunválaszt (*Oláh* és mtsai., 1984).

Csirkéből peritoneális exudátum sejtek izolálása nehéz. A hasüreg átmosásával, mint például az egér esetében, nem is lehetséges. Sejtdús peritoneális exudátum indukciójához a csirke hasüregébe izgató-gyulladáskeltő hatású anyagokat (keményítő, pepton, glikogén, Sephadex G-40) kell fecskendezni. Ezzel a módszerrel aktivált sejteket, köztük nagy számban macrophagokat lehet nyerni. A peritoneális exudátum adherens sejtjeinek közel 70%-a macrophag. A macrophag : heterophyl granulocyta arány függ a stimuláló anyagtól (*Sabet* és mtsai., 1977; *Trembicki* és mtsai., 1984).

1.2.11. A csirke MHC-je

A csirke MHC volt az első, amelyet az egér H-2 komplex után leírtak. A mai nomenklatúra szerint ezt B-komplexnek nevezik (1.2. táblázat).

1.2. táblázat.

A csirke és az egér valamint az ember megfelelő fő hisztokompatibilitási antigén-komplexének összehasonlítása.

Osztály	Csirke	Egér	Humán
I.	B-F	H2-K,D,	HLA-A,B,C
II.	B-L	H2-I	HLA-D,DR
III.	?	Ss/S1p	Bf,2C,4C
IV.	B-G	-	-

Összehasonlítva az egér és a humán MHC-vel a következőket mondhatjuk: A csirke MHC gének egy akrocentrikus kromoszómán találhatók, végleges sorrendjük még nem tisztázott (*Toivanen* és *Toivanen*, 1983; *Klein*, 1986).

Az MHC I. (B-F complex) génterméke minden magvas szomatikus sejt felszínén megtalálható. Csirkében is a celluláris cytotoxicitás targetstruktúrája, egy 40-43 kDa, valamint egy könnyebb 11-12 kDa molekulasúlyú, membránhoz kötött glikoprotein molekulából áll. A könnyűlánc ellenes ellenanyagok keresztreagálhatnak az emlősök ß-2 mikroglobulinjával.

Az MHC II. (B-L complex) génterméke megtalálható minden sejtfelszíni immunglobulinnal rendelkező sejten (B lymphocytákon), továbbá monocytákon, macrophagokon és egyes aktivált T

sejteken. Két polipeptid láncból áll, hasonlóan az emlősök II. osztályú MHC antigénjeihez.

Az MHC III. osztályú antigénjeinek megléte csirkében egyenlőre még kérdéses.

Az MHC IV. (B-G complex) géntermékeinek nincs emlősbeli megfelelője: a magvas vörösvérsejteken és azok prekurzorain mutathatók ki (*Toivanen* és *Toivanen*, 1983; *Klein*, 1986).

Az MHC tipizálás csirkében alloantiszérumok, illetve néhány monoklonális ellenanyag (anti-B-G) segítségével lehetséges.

Többek között, hasonlóan az egerekben megfigyeltekhez, a csirkék ellenanyagtermelése, mitogén ingerre adott válasza, valamint a kevert lymphocyta reakció is MHC gének által szabályozott folyamat (*Toivanen* és *Toivanen*, 1983).

1.2.12. Csirke eredetű lymphokinek

A legkorábbi megfigyelés a csirkék vírus indukálta interferon termeléséről intézetünkből származik. *Béládi* és *Pusztai* 1967-ben megállapították, hogy a humán adenovírusok csirke embrionális fibroblast tenyészethez adva interferon termelést váltanak ki (*Béládi* és *Pusztai*, 1967). A humán adenovírusok nemcsak *in vitro* sejtkultúrákban (*Béládi* és mtsai., 1969; *Mucsi* és mtsai., 1979), hanem *in vivo*, állatba oltva is interferon termelődést indukálnak (*Pusztai* és mtsai., 1969; *Béládi* és mtsai., 1979).

Pusztai és munkatársai csirke perifériás vér leukocytáiban Con A mitogénnel IFN termelést indukáltak. Meghatározták a kétféle interferon (a fibroblast-, illetve a leukocyta tenyészetekben adenovírussal indukált, és a leukocyta tenyészetekben

mitogénnel indukált interferon) fiziko-kémiai tulajdonságait. A Con A-val indukált interferon, a vírussal indukált interferonhoz hasonlóan, hőstabilnak bizonyult (60-70 °C). A mitogénnel indukált interferon még 60 °C-on 60 percig végzett hőkezelés után is teljes aktivitását megtartotta, a vírussal indukált interferon(ok) eredeti aktivitásuknak csak 20-45%-át őrizték meg. Savval történő kezelés a csirke mitogénnel indukált interferon aktivitását kevésbé csökkentette, mint azt a humán gamma interferon esetében tapasztalták. A mitogénnel indukált interferon molekulasúlya gélszűrés alapján 25 kDa-nek adódott (*Pusztai* és mtsai., 1986, *Taródi* és mtsai., 1975).

Eddig még nem teljesen eldöntött az a kérdés, hogy csirkében hányféle interferon termelődhet a különböző inducerek hatására. *Thacore* és mtsai. kutatásai szerint a Sendai vírus normál, illetve öröklött izomdisztrófiában szenvedő csirkék lép, thymus és Fabricius-féle tömlő sejtjeihez adva legalább kétféle interferon termelődését indukálja. A szerzők azt tapasztalták, hogy az így termelt csirke interferon-α antivirális hatású csirke embrionális fibroblast tenyészetekben és 1 óráig 60 °C-on inkubálva megőrzi aktivitását. Az α-1 interferon 1 óráig 60 °C-on inkubálva elveszti az antivirális aktivitását. A Fabricius-féle tömlő sejtek ellentétben a thymus és a lépsejtekkel csak az interferon α-1 termelésére képesek. Azt is megfigyelték, hogy az izom-disztrófiás csirkében mindkét fajta interferon szignifikánsan nagyobb mennyiségben termelődött, mint a normál állatokban (*Thacore* és mtsai., 1985).

Kohase és mtsai. szerint csirkében nincs meg az emlősökre jellemző 3 interferon típus. Csirke embrionális fibroblast tenyészetben Newcastle vírus hatására termelődött iterferon ellen nyúl anti-szérumot, illetve monoklonális ellenanyagot

állítottak elő. Mindkettő neutralizálta mind a 3 féle módon indukált csirkeinterferon antivirális hatását (*Kohase* és mtsai., 1986).

Csirkében is sikerült Con A-val indukált lépsejtek felülúszójában T sejt növekedési faktort (TCGF) kimutatni. A csirke TCGF fajspecifikus, illetve az egér TCGF nem hatásos a csirkesejtekre (*Schauenstein* és mtsai., 1982).

1.3. Csirkesejtekkel reagáló monoklonális és poliklonális ellenanyagok

Albini és *Wick* Fabricius-féle tömlő sejtek, illetve thymus sejtek ellen pulykában termelt szérumok (α-B és α-T savók) segítségével (a megfelelő kimerítések után) tanulmányozták csirkék egyedfejlődése során az egyes lymphoid szervek T és B sejt megoszlását. A központi nyirokszervekben a T és B sejtek aránya kb 24. hetes korig állandónak bizonyult. A lépben és a perifériás vérben az α-T savóval reagáló sejtek domináltak, míg a Harder mirigy sejtjeinek nagyrésze az α-B savóval reagált. A coccalis tonsillákban a kétféle sejt közel azonos arányban volt jelen. A 24 hetes csirkében talált értékeket az 1.3. táblázatban foglaltuk össze (*Albini* és *Wick*, 1974).

1.3. táblázat.

A thymus és a Fabricius-féle tömlő sejtjei ellen termelt savókkal reagáló sejtek százalékos megoszlása 24 hetes csirkékben.

	Bursa sejtek		Thymus sejtek		Lép sejtek		Vér sejtek		Harder-f. m. sejtek	
	IIF	CT	IIF	CT	IIF	CT	IIF	CT	IIF	CT
α-BS	60	50	10	<1	30	20	20	-	75	-
α-TS	20	10	90	80	55	55	60	-	10	-

IIF - indirekt immunfluoreszcenciás tesztben meghatározva
CT - complement dependens cytotoxicitási tesztben meghatározva

Pace ás mtsai. szolubilizált thymus membránantigének ellen készítettek nyúl antiszérumot. Két (T1 és T2) thymus-specifikus antigént azonosítottak, amelyekről kiderült, hogy bár a thymussejtek membránjához asszociált antigének, de nem jelennek meg a sejtek a felszínén (*Pace* és mtsai., 1978).

Schauenstein ugyancsak heteroantiszérumok segítségével jellemezte a csirke perifériás vér T és B lymphocytáit. Megállapította, hogy a sejtfelszíni antigének eloszlása a T, illetve B sejtek érése során megváltozik. A B1, illetve a T1 antigének a Fabricius-féle tömlő, illetve a thymus szervspecifikus antigénjei. Ezeket a sejtek az érésük során elvesztik, azaz a perifférián lévő lymphocytákon ilyen antigéneket már nem lehetett kimutatni. Az Lp antigén a B sejtek 80%-án, a T sejtek 40%-án található meg a perifférián, míg a Fabricius-féle tömlő sejtjeiről és a thymussejtekről hiányzik. Az L antigén az úgynevezett közös lymphocytaspecifikus antigén, amely minden sejten, így a

Fabricius-féle tömlő sejteken és a thymussejteken, valamint a perifériás B sejteken is megtalálható. A Fabricius-féle tömlő sejtjeire és a perifériás B sejtekre jellemző marker a sejtfelszíni immunglobulin (*Schauenstein*, 1979).

Pink és *Rijnbeek* monoklonális ellenanyagokat állitottak elő a csirke Fabricius-féle tömlő- és a thymus sejtjei ellen. Az egyik (X.14) a thymus cortikális sejtjeihez kötődik. Az L.17 jelű mind a Fabricius-féle tömlő, mind a thymus eredetű sejtekkel reagált, de valószinűleg más-más sejtfelszini strukturához kötődött, mivel a Fabricius-féle tömlő sejtek esetén egy 240 kDa-os, a thymussejtek esetében pedig egy 180 kDa-os molekulasúlyú glikoproteint precipitált ez az ellenanyag. Az L.22 jelű ellenanyag a Fabricius-féle tömlő sejtekkel reagált, de nem minden csirketörzsben: ennek a struktúrának a génje az MHC-hez szorosan kapcsoltnak bizonyult a genetikai analizis során. Az L.43 jelű ellenanyag Fabricius-féle tömlő eredetű sejtekkel, macrophagokkal és fibroblastokkal reagált (1.4. táblázat, *Pink* és *Rijnbeek*, 1983).

Houssaint és mtsai. előállitottak egy olyan monoklonális ellenanyagot (CL-1) amely az összes csirke eredetű leukocytával reagál. Ez az antigén azonban különbözik az L.17 ellenanyag által felismerttől (*Houssaint* és mtsai., 1987). *Trembicki* a csirke peritoneális macrophagokkal kapcsolódó monoklonális ellenanyagokat készitettek. Ezek közül 6 keresztreagál más haematopoetikus sejtekkel, mig kettő csak a macrophagokhoz kötődik (*Trembicki* és mtsai., 1986).

1.4. táblázat.

Monoklonális ellenanyagok reakciója különböző eredetű csirkesejtekkel.

Target sejtek	Monoklonális ellenanyagok			
	X.14	L.17	L.22	L.43
Bursa	1	90-95	90-95	95-98
Thymus	65-85	90-95	2-10	2-10
Vér	1	100	10-20	15-20
Lép	1-2	100	15-25	25-30
Con A blast	0	80	5-10	10
Macrophag	0	80	0	100
Fibroblast	0	0	0	100

A számok a pozitív reakciót mutató sejtek %-os arányát jelentik.

A felsoroltakon kívül természetesen még más, csirkesejtekkel reagáló ellenanyagokat is előállítottak, azonban ezek száma messze elmarad az egér, illetve humán sejtek antigénjeivel szemben kifejlesztett ellenanyagok száma mögött.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Tápfolyadékok és a kiegészítésükre használt anyagok, pufferek és egyéb anyagok

-Eagle-féle MEM (GIBCO, USA): Hank's alapú minimálisan szükséges tápfolyadék 0.35g/l $NaHCO_3$-al kiegészítve.

-RPMI1640: 2mMol L-glutaminnal, 2g/l $NaHCO_3$-al, 100mg/l streptomycinnel 10^5NE penicillinnel és 10% foetális borjúsavóval (FCS) kiegészítve.

A fentieket alkotórészeikből házilag mértük össze, és háromszor desztillált vízben oldottuk fel. A tápfolyadékok pH-ját 7.3-ra állitottuk be, és 0.2 µm-es pórusátmérőjű Millipore membránszűrőn sterilre szűrtük. A már sterilre szűrt és sterilitási próbán átesett tápfolyadékokat egészitettük ki az antibiotikumokkal és a steril, 56°C-on decomplementált FCS-sel. A kész tápfolyadékokat 0°C-on tároltuk.

-HAT-médium, 100x töménységű oldatnak készül 3x desztillált vízben, felhasználásakor complettált RPMI-t egészitjük ki vele:

-6-hydroxypurin (hypoxantin) 10^{-2}M, SIGMA, USA.

-4-aminofolsav és 4-aminopteroil glutaminsav (aminopterin) $4x10^{-5}$M, SIGMA, USA.

-timidin ($1.6x10^{-3}$M).

-HT-médium, mint a HAT, de aminopterint nem tartalmaz.

-DMSO (dimethyl sulfoxid) SIGMA, USA. 10%-os oldat, complett RPMI-ben.

-PEG polyetilén glykoll, 1500-as átlagos mólsúlyú.

-Haemolyzáló puffer (TRIS-NH_4Cl), pH 7.2

A.) 20.6 g/l tris-(hydroxi-methyl)-amino-metán

B.) 8.3 g/l NH_4Cl

A fenti törzsoldatokból 10 ml A-t és 90 ml B-t kell összemérni, a pH-t sósavval 7.2-re beállítani és sterilre szűrni.

-FCS, foetális borjúsavó, HUMAN, Magyarország.

-Tengerimalac complement. A complementforrás szívpunkcióval vett tengerimalac savó volt, amelyet -20 °C-on fagyasztva tároltunk. A felhasználás előtt az egyes poolok aktivitását és spontán toxicitását ellenőriztük és csak a nem toxicus savókat használtuk fel.

-Tripánkék oldat, sejtvitalitás vizsgálatokhoz (Tripan blue, Edward Gurr Ltd. Anglia): 0.14%-os törzsoldat háromszor desztillált vízben, 4 részhez 1 rész 4.25%-os NaCl oldat (NaCl, REANAL, alt.).

-Human recombináns interferon-αA és -αD-ért Sidney Pestka professzor úrnak tartozunk köszönettel. Felhasználásig -70°C-on tároltuk.

-Complett Freund adjuváns, DIFCO, USA.

-Ellenanyagok:

-anti-egér IgG-HRPO, HUMAN gyártmányú, Magyarország.

-anti-egér IgG-FITC, MILES gyártmányú, UK.

-anti-egér IgG-FITC, MILES gyártmányú, UK.

-anti-egér IgGAM-FITC, HUMAN gyártmányú, Magyaroroszág.

A fenti ellenanyagok mindegyike nyulak immunizálásával készült.

SZTE Egyetemi Könyvtár SZEGED 14.

-anti-egér immunglobulin, újzélandi fehér nyúl, ammóniumszulfát precipitációs módszerrel tisztított egér immunglobulinnal történő *sc.* immunizálásával állítottuk elő. Az immunglobulin dózisa 0.1 mg/kg volt, az immunizálások 4 alkalommal, hetenként történtek. Az utolsó oltást követően egy héttel a nyulat elvéreztettük, savóját decomplementáltuk és fagyasztva tároltuk.

-egér immunglobulin-isotípus ellenes ellenanyagokért Andó Istvánnak tartozunk köszönettel.

-Csirke haemolysin: csirkéket 4 alkalommal, egyhetes időközönként, 10^8 birkavörösvértesttel, *iv.* immunizáltunk. Az utolsó oltás után egy héttel elvéreztettük az immunizált csirkéket, savójukat összegyűjtöttük, decomplementáltuk és a további felhasználásig -20 ^oC-on tároltuk.

-Birkavörösvértest (BVVT). A SZOTE Klinikai Mikrobiológiai Intézetéből kaptuk Alsever oldatban.

-NaN_3, MERCK, 10%-os törzsoldat PBS-ben

-^{51}Cr izotóp, natriumkromát formában, 1.03 Gbq/ml, AMERSHAM Ltd, UK.

-H_2SO_4, MERCK, NSZK.

-$(NH_4)_2SO_4$, REANAL, Magyarország.

-Tween, detergens, SIGMA, USA.

-Perkoll, PHARMACIA FINE CHEMICALS, Svédország.

-Ficoll 400, PHARMACIA FINE CHEMICALS, Svédország.

-Uromiro, Olaszország.

-Etiléndiamin tetraecetsav natriumsója (EDTA), REANAL, Magyarország.

-Pararozanilin, REANAL, Magyarország.

-α-naftil acetát, REANAL, Magyarország.

-BIO-RAD fehérjemeghatározó reagens, REANAL, Magyarország.

-Orto-fenilén diamin (OPD), SIGMA, USA.

-CNBr aktivált Sepharose 4B, PHARMACIA FINE CHEMICALS, Svédország.

-Sephadex G50, PHARMACIA FINE CHEMICALS, Svédország.

-Szarvasmarha szérum albumin (BSA), HUMAN, Magyarország.

-Heparin, HUMAN, Magyarország.

-Tripszin, sertésből, HUMAN, Magyarország.

-Mikrotitráló lemezek:

- szövettenyésztő minőségűek, 96 lyukú, lapos aljúk, GREINER, NSZK.

-szövettenyésztő minőségűek, 96 lyukú, gömbölyű aljúak, GREINER, NSZK.

-ELISA minőségűek, 96 lyukú, lapos aljúak, GREINER, NSZK.

-24 lyukú szövettenyésztő edény (Costar lemez), GREINER, NSZK.

-Polisztirol petricsésze, mikrobiológiai minőségű, 22 cm-es, GREINER, NSZK.

2.2. A kísérletekben felhasznált állatok, sejtvonalak, vírusok

-Balb/c ($H\text{-}2^d$) egereket a Szegedi Biológiai Központ állatházából vásároltuk.

-állatházunkban random tenyésztett csirkék.

-állatházunkban random tenyésztett tengerimalacok.

-SP2/0 Balb/c eredetű, immunglobulint nem szekretáló myeloma sejtvonal.

-MDBK borjúvese eredetű sejtvonal.
-WISH emberi eredetű embrionális fibroblast sejtvonal.
-LSCC-H32 transzformált csirke fibroblast sejtvonal.
-VSV vesicularis stomatitis vírus.
-Human adenovírus, 12-es sérotípusú.

2.3. Monoklonális ellenanyagok előállítása

2.3.1. Az immunizálások

Immunizálások humán recombináns interferonnal

Az immunizálásokhoz 6 hetes Balb/c nőstény egereket használtunk. Az első oltáskor 5 µg-nyi, complett Freund adjuvánsban szuszpendált recombináns humán α-interferont oltottunk *sc.*, az egerek hátsó talpába. Három hét elteltével *ip.* oltásokkal megismételtük az immunizálást, azonban az adjuváns helyett PBS-t használtunk. Ezt követően még két alkalommal, egyhetes időközönként oltottuk az egereket. A második oltást követően az immunizálások eredményességét - a recombináns humán α-interferon ellenes ellenanyagok megjelenését - ELISA-teszttel ellenőriztük. Az ellenanyagok interferont neutralizáló képességét pedig az interferon antivirális hatását gátló aktivitásán keresztül teszteltük.

Immunizálás csirke perifériás vérből tisztított granulocytákkal

Hathetes Balb/c nőstény egereket perkollgrádiensen tisztított granulocytával *ip.* oltottunk ($5x10^6$ sejt/egér). Ezt

követően 3 hét múlva egerenként 10^7 granulocytával megismételtük az oltást. A sejteket mindkét alkalommal PBS-ben szuszpendáltuk fel.

Immunizálás Bursa Fabricii eredetű sejtekkel

A 11 napos csirkék Fabricius-féle tömlőjéből sejtszuszpenziót készítettünk és három nőstény Balb/c egeret intraperitoneálisan oltottunk $6x10^6$, PBS-ben szuszpendált sejttel. Három hét múlva megismételtük az oltást $7x10^6$ Fabricius-féle tömlő sejttel.

2.3.2. Sejtfúziók

A sejtfúziókat *Köhler* és *Milstein* módszerének (*Köhler* és *Milstein*, 1975) módosításával végeztük: a cervikális diszlokációval megölt Balb/c egerek hasüregébe FCS mentes RPMI 1640 tápfolyadékot fecskendeztünk és ezzel a hasüreget többször átmostuk. Az így nyert sejteket (feeder sejtek) 10^4 sejt/lyuk koncentrációban, 100-100 µl/lyuk tápfolyadékban 96 lyukú mikrotitráló lemezre osztottuk szét.

A fúzióhoz használt Sp2/0 myeloma sejteket egyszer, a lépsejteket háromszor mostuk FCS mentes RPMI-ben. Ezt követően összekevertünk $11x10^8$ lépsejtet $4x10^7$ Sp2/0 myeloma sejttel és 5 percig 880 g-vel centrifugáltuk őket. A felülúszót leszívtuk és a centrifugacsöveket 37°C-os vízfürdőbe állítottuk, majd állandó keverés mellett, egy perc alatt, 1 ml 50%-os polyetilén glikollt (PEG, átlagos mólsúlya 1500) adtunk hozzá. A sejtszuszpenziót tovább kevertük, majd fokozatosan hígítottuk. További állandó keverés mellett 1 ml FCS mentes RPMI 1640-et

adtunk hozzá, majd 8 ml-t újabb 2-3 perc alatt. Ezt követően a sejteket centrifugáltuk - 5 perc 150 g - és a felülúszó leöntése után 50-100 ml HAT médiumban szuszpendáltuk. A sejteket 100 µl -ként szétosztottuk az előző napon elökészített "feeder" sejteket tartalmazó, 96 lyukú, szövettenyésztési minőségű lemezekre.

2.3.3. A hybridomák tenyésztése

A fúziót követően a lép-myeloma hybridek HAT médiumban való növekedését inverz mikroszkóppal naponta ellenőriztük, így az esetleg fertőzött lyukakat is idejében észrevehettük és a fertőzést 20%-os kénsav becseppentésével eliminálhattuk.

A fúziót követően a sejteket kétnaponta "etettük", azaz a tápfolyadék felét frissre cseréltük.

A 10-14. napon érték el a tenyészetek azt a sejtszámot, (a telepek kb. 1 mm átmérőjúek) amikor a felülúszókat először tesztelni lehetett, vajon termel-e a hybridoma megfelelő ellenanyagot. A 14. naptól a médium fokozatos cseréjével áttértünk a "HT" (hypoxantint és timidint tartalmazó) tápfolyadékban való növesztésre. A kívánt specifitású ellenanyagokat termelő hybridomákat ezután először 24 lyukú Costar lemezekben, majd pedig petricsészékben tovább szaporítottuk.

2.3.4. A sejtek lefagyasztása, tárolása és feolvasztása

A megfelelő sejttenyészeteket (szuszpenziókat) lecentrifugáltuk, majd hideg, 10% dimethyl sulfoxidot (DMSO) tartalmazó complettált RPMI-ben felszuszpendáltuk. Fagyasztócsőbe

$10x10^6$ sejt/ml töménységû szuszpenziót raktunk és elõször -20°C-ra hûtöttük és lefagyasztottuk, majd -70°C-on tovább hûtöttük. Ezen a hõmérsékleten a sejtek további jelentõs károsodás nélkül több hónapig tárolhatók. Hosszabb idejû tároláshoz a sejteket cseppfolyós nitrogénbe helyeztük.

2.3.5. Klónozások

A kiválasztott hybridomákat az ún. "limiting dilution", azaz határhígításos módszerrel klónoztuk. A módszer lényege, hogy a "feeder sejtekkel" elõzõ napon elõkészített 96 lyukú lemez egy-egy lyukába átlagosan csak egy élõ, osztódóképes hybridomasejt jusson. Mivel a klónozás hatékonysága csak becsülhetõ, ezért három hígítást használtunk, rendre 0.3, 1, és 10 sejt/lyuk.

A klónok növekedését naponta ellenõriztük és megjelöltük azokat a lyukakat, amelyekben valóban egy sejtbõl kiinduló kolónia nõtt. Ezek felülúszóját teszteltük és a számunkra értékes immunglobulint termelõ klónokat felszaporítottuk.

2.3.6. Ascites termelés

A felszaporított hybridomasejteket PBS-ben kétszer mostuk, majd 10^7 sejtet oltottunk *ip.* Balb/c nõstény egerekbe. Az egereket 10-14 nap múlva cervikális diszlokációval megöltük és a termelõdött ascitest leszívtuk, hõvel decomplementáltuk és fagyasztva tároltuk.

2.4. Monoklonális ellenanyagok tesztelése

2.4.1. Indirekt immunfluoreszcencia

Kerekaljú, 96 lyukú mikrotitráló lemezbe 100 µl felülúszóhoz, vagy hígított asciteshez 0°C-os, 0.1% NaN_3-t tartalmazó complettált RPMI 1640-ben elökészített sejtszuszpenziót adtunk (10^7 µl-ben 10^6 sejtet). Harminc perces, jégen történö inkubálás után a sejteket négyszer mostuk hideg, azidos tápfolyadékban (complettált RPMI 1640) majd 1 : 100-as véghígitású nyúl-anti-egér IgGAM-FITC oldatból 15 µl-t adtunk hozzá. A 30 perces inkubálást újabb négy mosás követte. Végül a sejteket 30-30 µl, 0.1% NaN_3 -ot tartalmazó médiumban vettük fel és LEITZ gyártmányú UV mikroszkóppal, 600-as nagyítás mellett, viz immerziós fluoreszcens objektívvel határoztuk meg a membránfluoreszcenciát mutató sejtek %-os arányát.

2.4.2. Szilárd fázisú enzim immunoassay (ELISA)

A szilárd fázisú enzim-immunoassay-t *Hudson* és *Hay* (1980) módszere szerint végeztük. Röviden: lapos aljú mikrotitráló lemezt antigénnel érzékenyitettünk, azaz 50 µl-nyi PBS-ben, 50 ng recombináns humán α-A, vagy α-D interferont, illetve indirekt ELISA-nál 10µg/ml nyúl-anti-egér IgG-Fab2-t inkubáltunk 40 °C-on, 16 órán keresztül. Háromszori mosás után a lemez felületén maradt szabad kötöhelyeket 0.5% BSA oldattal telítettük (0.5% BSA PBS-Tweenben, 200 µl /lyuk, 37°C, 1 óra). Ezt háromszori mosás követte PBS-Tweennel, majd alosztályspecifikus, tormaperoxidázzal jelölt immunglobulinok, illetve protein A, vagy birka anti-egér-IgGAM-tormaperoxidáz konjugátum, megfelelö hígitású oldatából lyukanként 100-100 µl-t mértünk. Ezzel 60

percig 37°C-on inkubáltuk, majd háromszor mostuk. Az 5-ös pH-jú citrátpufferbe (60 ml) közvetlenül a felhasználás előtt mértük be a 10 µl H_2O_2-t és az OPD-t (ortophenylén-diamin, 20 mg/60 ml). Ezután a lemezeket sötétben, 40 °C-on inkubáltuk kb. 30 percig, majd a reakciót 4N H_2SO_4-el leállítottuk (50µl/lyuk). Az extinciós értékeket 493 nm-nél mértük Dynatech gyártmányú ELISA readerrel.

2.4.3. Interferon-neutralizációs teszt

A tesztben ellenanyagainknak az IFN antivirális hatását közömbösítő aktivitását határoztuk meg. *In vitro* fenntartott MDBK, illetve WISH sejtekhez felező hígításban adtuk a vizsgálandó ellenanyagokat, majd minden lyukba 5 NE interferont (recombináns humán α-A, D, illetve természetes leukocyta interferont) adtunk. 24 óra múlva vesiculáris stomatitis vírussal (VSV) fertőztük a tenyészeteket. Ezt egy 16 órás inkubálás követte, majd meghatároztuk az ellenanyagainknak azt a hígítását, amely mellett az interferon a vírus cytopátiás hatását 50%-ban felfüggesztette, azaz csak a sejtek 50%-a élte túl a fertőzést. Az ellenanyag interferon-neutralizációs titere a hígítás reciprokának és az interferon aktuális milliliterenkénti titerének a szorzata.

2.4.4. Complement dependens cytotoxicitási teszt

Kerekaljú mikrotitráló lemezre lyukanként $5x10^5$ sejtet mértünk és 100 µl ellenanyagot adtunk hozzá. Az inkubálás után

(30 perc, 37°C) egyszer mostuk a sejteket complettált RPMI-vel. Complementforrásként tengerimalac savó 1 : 16-os véghígítását használtunk. A complementtel a sejteket 37°C-on, 30 percig inkubáltuk, majd az értékelést tripánkék festékkizárásos módszerrel végeztük, azaz meghatároztuk az élő sejtek %-os arányát.

2.5. Immunglobulinok tisztítása (NH4)2SO4-os precipitációval

Az immunglobulint tartalmazó ascites folyadékot, vagy savót hővel decomplementáltuk és ugyanolyan térfogatú, telített (NH4)2SO4 oldat fokozatos hozzáadásával precipitáltuk. Ezt 30 percig szobahőmérsékleten kevertük. 1000 g-vel, 15 percig, 4°C-on centrifugáltuk és 50%-os $(NH_4)2SO_4$ oldattal egyszer mostuk az üledéket, majd a kiindulási térfogatnak megfelelő mennyiségű PBS-ben oldottuk. Ezután 40%-os végkoncentrációjú $(NH_4)2SO_4$-os precipitációt végeztünk. A 40%-os koncentrációjú $(NH_4)2SO_4$-os mosás után minimális térfogatú PBS-ben oldottuk az üledéket, majd 4°C-on, PBS-sel szemben dializáltuk. BIO-RAD reagenssel meghatároztuk a minták fehérjetartalmát.

2.6. Affinitás-kromatográfiás oszlop készítése

CNBr-rel aktivált Sepharose 4B-t 1 mM-os HCl-lel, 15 percig mostuk (200 ml/g), majd gyorsan 0.1 M-os, 8.8-as pH-jú $NaHCO_3$-al ismételtük meg a mosást. Ezt követően a 40 ml aktivált Sepharose szuszpenzióhoz 10 ml, 0.1 M-os $NaHCO_3$- oldaban felvett, 0.67 ml 25%-os glutáraldehidet mértünk, és 10 percig

rázattuk szobahőn. Ezt követően kb. 10-szeres térfogatú, 0.1 M-os $NaHCO_3$ oldattal mostuk és hozzáadtuk a gélhez az immunglobulin oldatot, úgy, hogy a fehérjeoldat : gél térfogat aránya 2 : 1 legyen, és 1 ml gélre kb. 10 mg fehérje jusson, majd 60 percig rázatva kevertük szobahőn. Az oszlopba töltés után a gélt 10-szeres térfogatban a következő oldatokkal mostuk:

- 0.1 M-os $NaHCO_3$, pH8.8, fehérjementességig
- 0.2M etanolamin, pH8.8, ezzel a maradék glutáraldehidet inaktiváltuk
- 0.1M Na acetát, 0.5M NaCl, pH4.1
- 0.1 M-os $NaHCO_3$, 0.5M NaCl, pH8.8
- végül pedig a start pufferel 4 ^{o}C-on ekvilibráltuk az oszlopot: 0.1 M-os $NaHCO_3$, pH8.8.

2.7. Affinitás-kromatográfia monoklonális ellenanyaggal

A recombináns humán α-interferon ellen termelt monoklonális ellenanyagokból készítettünk affinitáskromatográfiás oszlopot. Erre vittük fel az interferontartalmú mintát, és 4^{o}C-on háromszor átcirkuláltattuk az oszlopon, majd PBS-sel fehérjementességig mostuk. Az elúcióhoz 0.33 M glicint, 1 M-os glükózt tartalmazó 2.4-es pH-jú oldatot használtunk és 1 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. Ezt követően meghatároztuk az eluált minták fehérjetartalmát és interferon aktivitását.

2.8. Sejtszuszpenziók készítése

2.8.1. Leukocyták baromfi perifériás vérből

1.075 g/cm^3 sûrûségû Ficoll-Uromiro grádiensre rétegeztük a csirkéből szívpunkcióval nyert, 10 E/ml heparinnal alvadásgátolt és PBS-sel 3x-ára hígított vért. 800 g-vel, 20°C-on, 20 percig történő centrifugálás után az interfázisból összegyûjtöttük a fehérvérsejteket, és a PBS-sel való háromszori mosás után (600g, 10 perc) complettált RPMI-ben vettük fel és a vitalitás meghatározása után (tripánkék festékkizárásos módszer) beállítottuk a kívánt sejtkoncentrációt. Pulyka leukocyta preparáláshoz szárnyvénából vettünk vért.

2.8.2. Granulocyta frakció tisztítása

A fenti módon tisztított leukocytákból *Hjorth* és mtsai. (1981) módszere alapján granulocytákat tisztítottunk. Kétlépcsős perkollgrádiensre vittük fel a tisztított leukocyta szuszpenziót. A felsô fázisa 60%-os, az alsó 80%-os Perkoll-t tartalmazott. A szuszpenziót ezután 450 g-vel, 30 percig, 18°C-on centrifugáltuk. A felsô interfázisból a mononucleáris sejteket, az alsó interfázisból pedig a túlnyomórészt polymorphonucleáris sejteket nyertük.

2.8.3. Csirke perifériás vér adherens sejtjeinek tisztítása

A perifériás vérből az adherens sejteket plasztik adherenciájuk alapján különítettük el. A Ficoll-Uromiro grádiensen szeparált sejtek szuszpenziójából 30-30 ml-t, 10^7 sejt/ml koncentrációban, 22 cm átmérőjű, polisztirolból készült petricsészékbe mértünk és 24 órás tenyésztés után a le nem tapadt sejteket mosással eltávolítottuk. Az ádherens sejteket 0.05%-os EDTA tartalmú PBS-sel való kezelés után "gumirendőrrel" (rubber policeman), azaz egy steril radírlappal távolítottuk el a csésze aljáról, vagy további tenyésztés után használtuk fel őket. A felhasználás előtt PBS-sel mostuk a sejteket és a vitalitás meghatározás után complettált RPMI 1640-ben állítottuk be a kívánt sejtkoncentrációt.

2.8.4. Sejtszuszpenziók készítése lépből, thymusból és Bursa Fabriciiből

A thymus- és *Bursa Fabricii* sejtek preparálásához a donorok 1-3 hetes, a lépsejtekhez pedig 10-12 hetes csirkék voltak. A megfelelő nyirokszervek aseptikus eltávolítását és összegyűjtését a kötőszövettől való megtisztítás követte, majd a szerveket ollóval összedaraboltuk és complettált RPMI-ben üveglapáttal homogenizáltuk. A nagyobb, egészben maradt darabokat 5 perces ülepítéssel távolítottuk el a készülő szuszpenzióból a leszívott felülúszóból pedig centrifugálással nyertük ki a sejteket (300 g, 10 percig). A vitalitás meghatározás után complett RPMI-ben állítottuk be a kívánt sejtkoncentrációt.

2.8.5. Peritoneális exudátum sejtek indukálása és preparálása csirkéből

A peritoneális exudátum sejtek indukálására és kinyerésére *Sabet* és mtsai. (1977) módszerét alkalmaztuk. Röviden: 5-6 hetes csirkék hasüregébe 5-8 ml Sephadex G50-et fecskendeztünk. 72-96 óra múlva a csirkéket megöltük és a hasüreget megnyitva kimostuk belőle az ott összegyűlt sejteket. Ezután a szuszpenziót 10 percig, 270 g-vel centrifugáltuk és a sejteket PBS-ben szuszpendáltuk fel. A felszuszpendált sejteket 2 perces ülepítés után összegyűjtöttük és újból mostuk. Végül a sejtszám és a vitalitás meghatározását követően complett RPMI-ben beállítottuk a kívánt milliliterenkénti sejtszámot.

2.9. Csirke leukocyták funkcionális vizsgálata

2.9.1. Kezelések monoklonális ellenanyagokkal

A $1x10^7$ sejt/ml koncentációjú tisztított csirke leukocytát 30 percig, 37°C-on inkubáltunk az 1 : 100-as hígítású, ascitesben lévő monoklonális ellenyanyagokkal, majd complementforrásként 1 : 20-as véghígításban tengerimalac savót adtunk hozzá és további 45 percig inkubáltuk a cytotoxicitási reakció lejátszódásáig. A complementet nem kötő ellenanyagok esetén indirekt complement dependens cytotoxicitási reakciót alkalmaztunk, azaz az első ellenanyag kezelést követte egy második,

egér immunglobulinnokkal reagáló, complementet kötő savóval történő kezelés (nyúl anti-egér Ig-vel). A reakció lejátszódása után ellenőriztük a savókezelés hatékonyságát: tripánkék festékkizárásos módszerrel meghatároztuk a szuszpenziók vitalitását, illetve az elölt sejtek százalékos arányát.

2.9.2. Csirkesejtek kezelése tripszinnel

Csirkeleukocytákat ($1x10^7$sejt/ml) 45 percig inkubáltunk 37°C-on, 0.1%-os, PBS-ben oldott tripszinnel. A kezelés nem befolyásolta a szuszpenzók vitalitását. A kezelés után PBS-sel egyszer mostuk, majd complettált RPMI-ben szuszpendáltuk fel a sejteket és beállítottuk a kívánt sejtkoncentrációt.

2.10. Cytotoxicitási reakciók mérése

2.10.1. Természetes cytotoxicitási reakció (NK)

Az NK reakció méréséhez targetnek ^{51}Cr izotóppal jelölt LSCC-H32, adherens tenyészetet alkotó csirkeeredetű sejtvonalat használtuk. Az izotóppal való jelöléshez 0.05%-os tripszint és 0.02%-os EDTA-t tartalmazó oldattal történő 5 perces kezelés után felszuszpendáltuk a sejteket. Kétszeri mosás után (Eagle-féle tápfolyadék) $3-5x10^6$ sejtet jelöltünk 100 µCi króm izotóppal (37°C, 30 perc, majd újabb háromszori mosás következett).

2.10.2. Ellenanyagdependens sejtközvetítette cytotoxicitás (ADCC)

A méréshez csirke haemolysinnel szenzibilizált birkavörösvértesteket (BVVT) használtunk. Az 5%-os BVVT szuszpenzióból $2\text{-}5x10^7$ sejtet jelöltünk ^{51}Cr izotóppal (75 perc, 200 µC izotóp). Az inkubáció utolsó 30 percében a szuszpenzióhoz *ana partes*, megfelelően hígított csirke haemolysint adtunk. Az inkubációs idő leteltével a szabad izotópot és a felesleges haemolysint háromszori mosással távolítottuk el. Végezetül a sejtkoncentrációt $5x10^5$ BVVT/ml-re állítottuk be.

2.10.3. A cytotoxicitási reakciók kiértékelése

Az izotóppal jelölt targetsejteket állandó sejtszámban adtuk a változó számú effektorsejthez (leukocyta, granulocyta, monocyta szuszpenziók). Mikrotitráló lemezen, 200-200 µl végtérfogatú complett RPMI-ben összeállított minta minden effektorsejt hígításából három-három párhuzamost készítettünk. Az inkubációs idő NK-reakció esetén 4, ADCC-reakciónál pedig 18 óra volt. Az inkubációs idő leteltével a mintáinkat tartalmazó mikrotitráló lemezeket 350 g-vel 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszók felét leszívtuk és gamma-számlálóval meghatároztuk a radioaktivitásukat cpm-ben (beütés per perc) és kiszámítottuk a cytotxicytási %-ot:

$$C\% = \frac{\text{experimentális release - spontán release}}{\text{a beépült aktivitás}} * 100\%$$

A beépült aktivitás az izotóppal jelölt sejtek által felvett aktivitással, a spontán release pedig az inkubációs idő leteltéig a targetsejtekből az effektorsejtek nélkül, spontán a felülúszóba jutó aktivitással arányos. A spontán release birka vvt-k esetében a maximális release 10-12%-a, egyéb targetsejtek esetén pedig 12-15%-a volt.

2.11. Az interferontermelés indukciója csirkesejtekben

A csirke perifériás vér leukocytákat, illetve lépsejteket $1x10^7$, monocytákat pedig $1x10^6$ sejt/ml koncentrációban használtunk interferon termelésére. Az interferoninduktor 12-es típusú humán adenovírus volt. A vírussal kezelt, illetve a kezeletlen sejttenyészetek felülúszóit kétnapos inkubáció után gyûjtöttük össze és az interferontartalmukat cytopátiás hatást neutralizáló tesztben határoztuk meg.

2.12. Csirke leukocytainterferon titrálása

Összefüggő monolayert alkotó, csirke szekunder embrionális fibroblast tenyészetet készítettünk 5% FCS-t tartalmazó Eagle médiumban. A kultúrákat a tesztelendő interferon felező hígításaival kezeltük, majd 24 óra múlva 10^5 PFU/ml VSV-vel fertőztük és további 16 órán át tenyésztettük. Ezután megkerestük az interferon mintának azt a hígítását, amely mellett a vírus cytopátiás hatása 50%-os volt, azaz az interferon a sejtek (másik) 50%-át megvédte. Ezzel párhuzamosan egy nemzetközi standard interferonkészítmény titerét is meghatároztuk. A nem-

zetközi standard interferon aktuális titerének a vizsgált mintánk hígításának reciprokával alkotott szorzata adja az interferon mintánk aktivitását.

2.13. Nemspecifikus észteráz festés

Mikroszkópiában használt, üvegből készült fedőlemezeken inkubáltuk az adherens sejteket tartalmazó szuszpenziókat. A kitapadt sejteket szobahőn szárítottuk, majd 10 percig, 4°C-on fixáltuk (a fixáló oldat: 0.5 mg/ml Na_2HPO_4, 1 mg/ml KH_2PO_4 100 ml-nyi oldatához 45 ml aceton, 25 ml formaldehid és 30 ml desztillált viz, pH 6.6). Ezt követően desztillált vizzel öblítettük és szobahőn szárítottuk a mintáinkat. A nemspecifikus észteráz reagens frissen készült: 1 ml pararozanilin-HCl-t kell oldani 25 ml meleg, 2N HCl-ben és 1 : 1 arányban kell hozzáadni a 40 mg/ml töménységű $NaNO_2$ oldatot. A keveréket 1 percig állni hagyjuk. Az így hexazotizált paranozanilin 0.5 ml-ét 69 ml, pH 6.6-os foszfátpuffer és 6 ml α-naftil acetát oldat keverékéhez adtuk (1 g α-naftil acetát 50 ml dimetil formamidban oldva). A mintákat 45 percig 37°C-on inkubáltuk a fenti reagensben, majd háromszor desztillált vizzel öblítettük. A reagáló (nemspecifikus észteráz pozitív) sejtek pirosra festődtek.

2.14. EA-rozetta képzés csirke leukocytákkal

Csirke haemolysinnel szenzibilizált birka vvt ($2x10^6$ BVVT) 0.2 ml-ét összekevertük az $5x10^6$ sejt/ml koncentrációjú tisztított csirke leukocyta, illetve granulocyta szuszpenzió 2 ml-ével. A 150 g-vel lecentrifugált szuszpenziót ezután 2 órán át,

37°C-on, majd további 16 órán át, 4°C-on inkubáltuk. Ezután óvatosan felszuszpendáltuk a sejteket és meghatároztuk a rozettát alkotó sejtek arányát.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Humán α-interferonnal reagáló monoklonális ellenanyagok

3.1.1. Előállítás és tesztelés

A recombináns humán α-interferonnal 4 db Balb/c egeret immunizáltunk. Célunk az volt, hogy a majdani sejtfúzióhoz a legjobb ellenanyagtermelő egereket használhassuk, ezért a második immunizálás után direkt ELISA-teszttel meghatároztuk az egyes egerek szérumának anti-interferon aktivitását. A teszt eredményét a 3.1.1 táblázatban foglaltuk össze.

3.1.1.táblázat.

A recombináns humán α-interferonnal 2x immunizált Balb/c egerek szérumának anti-interferon aktivitása direkt ELISA tesztben.

Az egér kezelése	E_{495}
immunizálatlan	0.181
immunizált 1.	>1.500
immunizált 2.	1.420
immunizált 3.	1.431
immunizált 4.	1.328

Minden savóhígítás 1:1000, a 495 nm-en mért extinciós értékeket három párhuzamos minta átlagából határoztuk meg.

A 3.1.1. táblázatból látható, hogy az immunizálás hatására minden egérben magas anti-interferon aktivitás volt kimu-

tatható, azaz minden egér termelt interferon ellenes ellenanyagot. A fúzióhoz a legmagasabb aktivitású, az 1. számú egér lépsejtjeit használtuk. A fúzió előtt azonban elvégeztünk még egy ellenőrző vizsgálatot: meghatároztuk az 1. számú egér savójának interferon neutralizáló aktivitását is. Ez MDBK sejteken tesztelve $2.7x10^7$ NE interferon/ml szérum volt, tehát ebben az egérben olyan interferonellenes ellenanyagok is képződtek, amelyek képesek voltak az interferon funkcionális aktivitását gátolni.

A sejtfúziót az utolsó ("booster") oltás után 3 nappal végeztük. A mosásokat követően a sejtszuszpenziót, a benne levő hybridekkel együtt, 50 ml HAT médiumban hígítottuk és 100-100 µl-t mértünk ki belőle lyukanként, ezzel összesen 480 mikrokultúrát hozva létre. Ezek közül 406-ban (85%) tapasztaltunk hybridoma növekedést (3.1.2.táblázat).

Inverz mikroszkóppal naponta ellenőriztük a hybridomák növekedését. Amikor a kultúrák elérték a megfelelő sejtszámot - kb. 1 mm átmérőjű "clump-okká" (sejthalmazokká) növekedtek - ELISA-módszerrel teszteltük a felülúszók interferonellenes ellenanyag tartalmát. Összesen 113 kultúrában találtunk pozitív reakciót (3.1.2. táblázat), azaz a felülúszót nem tartalmazó kontroll lyukaknál mért extinciós értékek átlaga, + "3x a szórás"-nál magasabb extinciós értéket.

A pozitív hybridomákból 24 lyukú "Costar" lemezen több párhuzamos tenyészetet indítottunk, hogy felszaporítsuk a potenciálisan igéretes sejtvonalakat és hogy a következő lépésben több párhuzamossal ismételhessük meg a vizsgálatot. A második tesztsorozat eredményeként mindössze 12-re csökkent a pozitív kultúrák száma (3.1.2. táblázat).

3.1.2.táblázat.

A tesztelt hybridomák száma az előállítás egyes lépéseiben

Hybridoma előállítás lépése	Tesztelés módja	A klónok-lyukak száma pozitív	össz	%
96 lyukú lemezen	vizuális	406	480	85
96 lyukú lemezen	ELISA	113	406	28
24 lyukú lemezen	ELISA	12	113	11
klónozás után	ELISA	9	12	75

E hybridomák monoklonalitását biztosítandó, határhígításos módszerrel reklónoztuk a tenyészeteket és így összesen 9 különböző, monoklonális ellenanyagot termelő hybridomát nyertünk.

A klónozással párhuzamosan vírusneutralizációs tesztben meghatároztuk az interferonellenes ellenanyagok anti-interferon aktivitását is.

3.1.2. Az α-interferon ellen termelt monoklonális ellenanyagok interferont neutralizáló aktivitása

In vitro az MDBK, illetve WISH sejtek VS vírussal való fertőzés után elpusztulnak. Mivel az interferonok egyik legjellemzőbb tulajdonsága, hogy védenek a vírusok cytopathiás hatásától, az ellenanyagaink interferon ellenes specificitását

az bizonyíthatja legjobban, ha az interferon funkcionális aktivitását is sikerül vele gátolni. Az immunizált egér savója tartalmazott olyan ellenanyagokat, amelyek képesek voltak a recombináns humán α-interferon vírus okozta cytopathiás hatástól védő aktivitását felfüggeszteni. Első kérdésünk tehát az volt, hogy monokonális ellenanyagaink közül melyek rendelkeznek ilyen képességgel, a másik pedig az, vajon keresztreagálnak-e a monoklonális ellenanyagaink valamelyik másik interferon szubtípussal.

Az I.A1, II.A1, II.A2, II.A5, III.D5 és a IV.C5 jelű hybridomáinkat szingén egerek hasüregébe oltva ascites formában növekedtek. Az így megtermelt ascites sejtmentes felülúszójának 2-2 ml-éből ammónium szulfátos precipitációval immunglobulinokat tisztítottunk. A preparátumoknak PBS-sel szemben történt dializise után BIO-RAD reagenssel meghatároztuk az összfehérje tartalmát és egységesen 0.5 mg/ml-re állítottuk be. A teszteket az *in vitro* növesztett hybridomák médiumából, illetve az ascitesekből származó ellenanyagokkal végeztük, amint ezt a 3.1.3. táblázatban is jelezzük.

Az α-A szubtípusú interferont neutralizáló aktivitás

Ezt az interferon szubtípust használtuk az egerek immunizálásához. A hybridomák izolálásakor a 12 hybrid tenyészetből vett felülúszót összesen 6 tesztben vizsgáltuk. Két alkalommal WISH-, négy alkalommal pedig MDBK targetsejteket használtunk. A 3.1.3 táblázatban az egyes sejtvonalakon végzett titrálások átlagát tüntettük fel.

Az I.A1-, az I.A2-, az I.B2-, valmint a II.A6-, a III.D5-, és a IV.D4-es monoklonális ellenanyagok gyakorlatilag

egyik sejtvonalon, egyik kísérletben sem mutattak interferon neutralizáló hatást. A II.D5 jelű hybridoma immunglobulinjai érdekes módon csak az MDBK sejteken tesztelve voltak inteferon neutralizáló hatásúak, a felülúszó titere két vizsgálat átlagaként 2901, vagyis a felülúszó 1 ml-e 2901 nemzetközi egység recombináns humán αA-interferon neutralizálására képes. A II.A2 hybridoma viszont csak a WISH sejteken tesztelve volt interferon neutralizáló hatású, ezeken a sejteken az átlagos titere 5500 NE volt.

A többi ellenanyag, mindkét sejtvonalon igen magas titerben képes neutralizálni a recombináns humán α-A interferont. Az MDBK sejteken 10000 egységnél magasabb neutralizációs aktivitásúak a II.A1, a II.A5 és a IV.C5 jelű monoklonális ellenanyagok, de az I.A3- és a II.D5-ös hybridomák is 1199, illetve 2901 egység interferon neutralizálására képesek. A WISH sejteken tesztelve kiemelkedő aktivitásúnak bizonyult két ellenanyag: a II.A1 és a IV.C5.

Mivel későbbi céljaink között szerepelt az is, hogy a monoklonális ellenanyagainkat affinitás-kromatográfiai célokra is felhasználjuk, ezért azokból a hybridomákból, amelyek ascites formában is nőttek, ammóniumszulfátos módszerrel immunglobulin preparátumot készítettünk (3.1.4. táblázat)

A tisztítási procedúra során a két alacsonyabb aktivitású ascitesből származó ellenanyag (a II.A2 és a II.A5) elvesztette az interferonneutralizáló aktivitását azonban a magas titert mutató, "legaktívabb" ellenanyagokból készült preparátumok megőrizték az interferon neutralizáló képességüket. Meghatároztuk azt is, hogy a hígítatlan fehérjepreparátumoknak mennyi volt a neutralizációs titere: a II.A1 estében a 26 mg/ml-es fehérjetaratalom mellett $3.5x10^6$, a IV.C5 estében

pedig a 32 mg/ml-es fehérjetartalomhoz $188x10^6$-os titer tartozott. Ezek az adatok arra utalnak, hogy e két utóbbi ellenanyagunk elvileg alkalmas lehet affinitáskromatográfiás oszlop készítésére.

A következőkben ismertetendő kísérletben az EGIS Gyógyszergyár B77 kódjelű, nátiv humán α-interferont tartalmazó interferon készítményét használtuk, egyébként a neutralizációs teszt kivitelezése megegyezett a korábban leírtakkal.

Ennek az interferon készítménynek az aktivitását a II.A1 és a II.A5 ellenanyagok igen kis mértékben, a IV.C5 valamivel jobban neutralizálta, de ez a hatás sem volt olyan élesen megjelenő a titrálás során, mint azt a recombináns humán α-interferon esetében tapasztaltuk. Ennek ellenére a IV.C5 jelű hybridomából származó ascites ml-ként 1700 NE nativ humán interferont volt képes neutralizálni.

3.1.3.táblázat.

A monoklonális ellenanyagok recombináns humán αA-interferont neutralizáló titere nemzetközi egység per milliliterben (NE/ml) VSV-vel fertőzött MDBK és WISH sejteken.

Hybridoma neve	Targetsejtek MDBK	WISH
I.A1 asc	0	0
I.A2	0	0
I.A3	1199	2400
I.B2	0	0
II.A1 asc	11150	60150
II.A2 asc	20	5500
II.A5 asc	10067	1267
II.A6	35	68
II.D5	2901	0
III.D5 asc	0	57
IV.C5 asc	10742	384803
IV.D4	37	57

Az interferon neutralizációs titereket a WISH sejteken 2 vizsgálat, az MDBK sejteken pedig 2-4 vizsgálat átlagából számítottuk. Az asc jelzésűek ascitesből, a többi ellenanyag az *in vitro* tenyészetek felülúszójából származik.

3.1.4.táblázat.

Ascitesből tisztított immunglobulinok interferon neutralizációs aktivitása (NE/ml)

Hybridoma	Ascites	0.5 mg/ml tisztított Ig
II.A1	60150	67600
II.A2	5500	0
II.A5	1267	0
IV.C5	384803	286000

Az ellenanyagokat ammóniumszulfátos módszerrel tisztítottuk és a fehérjekoncentrációt 0.5 mg/ml-re állítottuk be.

3.1.3. A human α-D szubtípusú interferont neutralizáló aktivitás hiánya

Ezt a másik leukocyta interferon szubtípust mind ELISA, mind interferonneutralizációs tesztben megvizsgáltuk.

Ezekben az esetekben hybridoma tenyészetek felülúszóját, illetve a IV.C5 és a II.A1 esetén ascites folyadékot használtunk. A két vizsgált ascites közül 100x-os hígítás mellet csak a IV.C5 reagált ezzel az interferon szubtípussal ELISA tesztben.

3.1.4. A recombináns humán α-interferonnal reagáló monoklonális ellenanyagok szubtípusainak meghatározása

Mivel az egér immunglobulinok típusának, illetve szubtípusának meghatározásához szükséges ellenanyagok csak minimális mennyiségben álltak a rendelkezésünkre, csak a legfontosabbnak tûnô hybridomáinkat tesztelhettük. A szubtípus meghatározásokat, mint azt az anyag és módszer címû fejezetben már részletesen leírtuk, ELISA technikával végeztük. A vizsgált hybridomák a következôk voltak: I.A3, II.A1 és a IV.C5. Az eredmények szerint mindhárom ellenanyag az IgG1 alosztályba tartozik és egyiknek sincs protein A kötô képessége.

3.1.5. Interferon tisztítás affinitás kromatográfiával

Az ascitesbôl történô immunglobulin preparálás során egy meglehetôsen durván tisztított fehérjefrakciót nyertünk, ezért fennállt annak a veszélye, hogy az immunglobulinok kromatográfiás oszlopra kötése után, az esetleg a készítményben maradt proteázok, tönkreteszik az affinitáskromatográfiás oszlopot. Ezt elkerülendô, kazein hidrolizálási tesztet csináltunk az ammónium szulfátos módszerrel tisztított immunglobulin preparátummal és csak annak a negatív eredménye után, tehát amikor már kizártuk a proteázokkal való szennyezettség lehetôségét, kezdtünk az oszlopkészítéshez.

CNBr-rel aktivált Sepharose 4B 1 grammjához összesen 10 mg fehérjét tartalmazó tisztított immunglobulint adtunk a IV.C5 monoklonális ellenanyagból, így 3.5 ml térfogatú oszlopot tudtunk készíteni. A fehérje kötődésének hatékonyságát a nem kötődött fehérje visszamérésével ellenőriztük: a 10 mg-ból 8.6 mg az aktivált Sepharose 4B-hez kötődve az oszlopon maradt.

A tisztítás során a recombináns humán αA-interferonból 1.5 ml-es térfogatban 59 µg-ot (7500 NE-nek megfelelő mennyiség) vittünk fel az affinitáskromatográfiás oszlop tetejére, 15 ml/óra átfolyási sebességgel. Ezután PBS-sel fehérjementességig mostuk az oszlopot. A mosófolyadékot 1 ml-es frakciókba gyűjtöttük. Meghatároztuk minden frakció összfehérje tartalmát és ezzel párhuzamosan vírusneutralizációs teszttel a benne levő interferonaktivitást. A mérések szerint egyik mosó frakcióban sem volt kimutatható mennyiségű interferon, tehát a felvitt anyag maradéktalanul kötődött az oszlopra.

Az interferon elúciója alacsony pH-jú közegben történt (0.35 M glicin és 0.1 M glükóz, pH 2.4), ezért az egyes frakciók interferontartalmának meghatározása előtt a pH-t 1N NaOH-val 7-re állítottuk be. Az elúciók során kapott, összesen 10, 1-1 ml-es térfogatú frakció közül négyben volt kimutatható menyiségben fehérje és ezzel párhuzamosan interferon aktivitás is (3.1.5. táblázat).

A visszanyert fehérje 49 µg, a visszanyert össz interferon aktivitás pedig 5200 NE volt, tehát az oszlopon a kitermelés interferon aktivitásra nézve 69%-os volt.

3.1.5.táblázat.

Az interferon elúciója során kapott frakciók fehérje tartalma és interferon aktivitása

A frakció száma	Fehérje konc. µg/ml	Interferon titer NE/ml
6.	0	0
7.	22	2800
8.	17	1500
9.	10	900
10.	0	0
Összesen:	49	5200

3.2. Csirkesejtekkel reagáló monoklonális ellenanyagok előállítása

Első célunk csirke granulocytákkal reagáló monoklonális ellenanyag előállítása volt, ezért Balb/c egereket immunizáltunk csirke perifériás vérből tisztított granulocytákkal. Ebből az immunizálásból két sejtfúziót végeztünk. A következő sorozatban, melyel elsősorban a csirke B-lymphocytáival reagáló monoklonális ellenanyagok nyerése volt a célunk, *Bursa Fabricii* eredetű sejteket használtunk az egerek immunizálásához. Ebben az esetben egy egeret használtunk fel a sejtfúzióhoz.

3.2.1. Fúziók tisztított granulocytákkal immunizált egerek lépsejtjeivel és a hybridomák izolálása

A granulocytákkal történt immunizálásokat részletesen ismertettük az anyag és módszer fejezetben. Az immunizálások után két egér lépét, lépenként $5x10^7$ sejtet, egymástól függetlenül, $4x10^7$ Sp2/0 myeloma sejttel fúzionáltattunk. A két független fúzióból származó sejteket 50-50 ml HAT médiumban szuszpendáltuk fel és összesen 10 db, laposaljú mikrotitráló lemezre osztottuk szét. A 960 lyukból 771-ben azaz a kultúrák 88%-ában volt hybridoma növekedés (3.2.1. táblázat).

3.2.1.táblázat

A granulocytákkal végzett immunizálás utáni fúzióból származó hybridomák száma a monoklonális ellenanyag előállítás egyes lépéseiben.

A hybridoma előállítás lépése	Tesztelés módja	A klónok-lyukak száma pozitív	össz	%
96 lyukú lemezen	vizuális	771	960	88
96 lyukú lemezen	I.Immunofluor.	69	771	9
24 lyukú lemezen	I.Immunofluor.	32	69	47

Az I.Immunofluor. az indirekt immunofluoreszcenciás tesztet jelöli.

Amikor a hybridomák elérték a megfelelő sejtszámot, a kulturákat indirekt immunfluoreszcenciás módszerrel teszteltük: van-e közüttük olyan, amelyik reagál a csirke perifériás vérből készült szuszpenzió sejtjeivel? A tesztelés erdményeként a 771 tenyészetből összesen 69 pozitivan reagáló kultúrát találtunk.

Azokat a kultúrákat, amelyek felülúszója ebben a tesztben valamilyen sejttel reagált, 24 lyukú "Costar" lemezen felszaporitottuk és megismételtük a vizsgálatot. Igy összesen 32 klónunk maradt.

3.2.2. Fúziók Bursa Fabricii eredetű sejtekkel immunizált egerek lépsejtjeivel és a hybridomák izolálása

Ugyancsak az anyag és módszer fejezetben leirtak szerint történt a *Bursa Fabricii* sejtekkel az egerek immunizálása. Az immunizálások után egy egér lépéből származó $8x10^7$ sejtet $2x10^7$ Sp2/0 sejttel fúzionáltattunk. A sejteket a szokásos 50 ml HAT médiumban vettük fel és 5 db, 96 lyukú, laposaljú lemezre osztottuk szét. A hybridizációs gyakoriság olyan magas volt, hogy minden kultúrában volt hybridoma növekedés. Ez valószínüsitette, hogy egy-egy lyukban nem csak egy, hanem akár több hybridoma is növekedett. Ez viszont gyors klónozást tett szükségessé. Az első klónozáskor 72 kultúra felülúszója reagált a perifériás sejtek valamelyikével.

SZTE Bérelemi Könyvtár SZEGED 14

3.2.3. A csirkesejtekkel reagáló ellenanyagokat termelő hybridomák tesztelése.

Monoklonális ellenanyagaink tesztelése immunfluoreszcenciás módszerrel

A kétféle fúzióból származó hybridomákat az elnevezésük alapján is elkülöníthetjük. Míg a granulocytákkal való immunizálást követő fúzióból származó hybridomákat egy szám-betű-szám (pl. 2B1) kombináció jelöli, addig a *Bursa Fabricii* sejtekkel immunizált egerekből származó hybridomákat két, "per" jellel elválasztott számmal jelöltük (pl. 1/9). Azokat a klónokat, amelyek az előzetes vizsgálatok szerint csirke vörösvérsejtekkel, vörösvérsejtekkel és leukocytákkal, vörösvérsejtekkel és thrombocytákkal regáltak a további feldolgozásból kihagytuk. A továbbiakban a két fúzióból származó hybridomákat együtt ismertetjük.

A vizsgálatok eredményeit táblázatokban foglaltuk össze. A táblázatokban az adott szuszpenzióban levő pozitív sejtek százalékos arányát tüntettük fel. E vizsgálatok során a következő sejtekkel adott reakciókat értékeltük:

- csirkeerdetű perifériás leukocyták (3.2.2. és 3.2.3. táblázatok)
- csirkeerdetű perifériás sejtekből szeparált plasztik adherens sejtek 1 és 3 napos adherencia után (3.2.4.táblázat)
- Fabricius-féle tömlő sejtjei (3.2.2 és 3.2.3 táblázat)
- thymussejtek (3.2.2 és 3.2.3 táblázat)
- lépsejtek (3.2.2 és 3.2.3 táblázat)

- peritoneális exudátum sejtek (3.2.4 táblázat)
- szekunder embrionális fibroblastok (3.2.4 táblázat)
- LSCC-H32 transzformált fibroblast sejtek (3.2.4 táblázat)
- pulyka perifériás vérsejtek (3.2.4 táblázat)
- humán perifériás vér leukocták (nincs feltüntetve, egyik ellenanyag sem reagált vele)

A további kísérleteket csak az érdekesebbnek ígérkező ellenanyagokkal végeztük el. Ezek közül néhányat sikerült a Turkui Egyetem Mikrobiológiai Intézetével kollaborációban cytofluorometriás módszerrel is feldolgozni.

Cytofluorometriás (FACS) vizsgálatok

Ehhez Coulter EPICS cytofluorométert (Coulter Electronics, Hialeak, FL) használtunk. A 488 nm-es, 2W-os argon ion lézersugár útjában elhaladó sejteket előrefelé és a 90 fokos szögben való fényszórásuk alapján analizáltunk és ez alapján különböző sejttípusokat azonosítottunk: pl. granulocytákat, különböző lymphoid sejteket, vagy nagy erithrocytákat. A gép alkalmas az indirekt immunfluoreszcenciás vizsgálatok során észlelt FITC fluoreszcencia kvantitatív mérésére és értékelésére is. Egy-egy mérés alkalmával legalább 10000 sejt adatait dolgoztuk fel. Az eredmények értékelése a gép software-éhez tartozó STATPACK és QUADSTAT programok alapján történt.

Ezzel a módszerrel négy ellenanyagunkat az 1C3, 1C2, 2C4 és a 2C5 sikerült megvizsgálni.

3.2.2 .táblázat.

A csirkesejtek ellen termelt hibridomák tesztelése immunfluoreszcenciás módszerrel I.

Target hybr.	Perifériás leukocyta	Tisztított granulocya	Bursa Fabricii	Thymus sejtek	Lép sejtek
1C3	17	80	0	0	28
2C4	15	80	30	0	13
2C5	35	14	0	0	0
2B1	13	-	100	0	12
1C2	17	50	0	0	15
1C1	20	80	0	0	30
B2	17	50	0	0	20
B3	30	49	0	0	17
1B2	14	5	0	0	0
1B3	16	68	0	0	0
1B4	40	55	0	17	22
1D3	30	60	0	0	22
2A1	20	80	7	7	9
2D1	20	-	0	0	40
1A6	55	70	100	60	95
1C4	70	80	100	100	24
1D5	78	80	77	100	70

A táblázatban a hybridomák ellenanyagaival reagáló sejtek %-os arányát tÜntettük fel.

3.2.3.táblázat.

A csirkesejtek ellen termelt hibridomák tesztelése immunfluoreszcenciás módszerrel II.

Target ---------- Hybr.	Perifériás leukocyták	Bursa Fabricii sejtek	Thymus sejtek	Lépsejtek
1/3	13	5	0	13
1/6	10	9	0	7
1/9	12	25	0	29
1/17	10	30	0	21
1/22	12	15	0	25
1/24	9	50	0	14
2/2	10	40	0	26
2/12	13	50	0	17
2/13	13	45	0	8

A táblázatban a hybridomák ellenanyagaival reagáló sejtek %-os arányát tÖntettük fel.

3.2.4.táblázat.

A csirkesejtek ellen termelt hybridomák tesztelése immunfluoreszcenciás módszerrel III.

Target / hybr.	Secunder emrionális fibroblaszt	LSCC-H32	Pulyka perif. leukocyták	Adherens sejtek. 1. nap	Adherens sejtek. 3. nap	Peritoneális exudátum sejtek
1C3	13	0	0	18	18	18
2C4	35	0	0	20	66	21
2B1	58	100	0	29	28	58
1C2	8	0	0	-	-	-
1C1	11	0	16	-	-	-
B2	0	0	25	-	-	-
B3	6	0	0	-	-	-
2A1	10	0	20	-	-	-
2C5	50	10	100	50	0	-
1A6	0	0	-	-	-	-
1C4	0	0	35	-	-	-
1D5	0	0	0	-	-	-
1/3	0	0	-	-	-	-
1/6	0	0	-	-	-	7
1/9	0	0	-	15	55	40
1/17	0	0	-	-	-	31
1/22	0	0	-	-	-	24
1/24	100	0	-	-	-	0
2/2	0	0	-	-	-	0
2/12	100	50	-	-	-	23
2/13	0	0	-	-	-	17

A táblázatban a hybridomák ellenanyagaival reagáló sejtek %-os arányát tOntettük fel.

3.2.5.táblázat.

A csirkesejtek ellen termelt hybridomák tesztelése cytofluorimetriás módszerrel.

Target ------ Hybridomák	Perifériás leukocyták	Thrombocyta mentesített perif.leukocyták	Granulocyták	Bursa sejtek	Thymus sejtek	Lép sejt.	Csontvelő sejtek
1C3	20	0	95	0	0	0	0
2C4	13	8	93	20	0	14	0
1C2	15	6	51	0	0	9	0
2C5	24	0	-	0	0	0	0

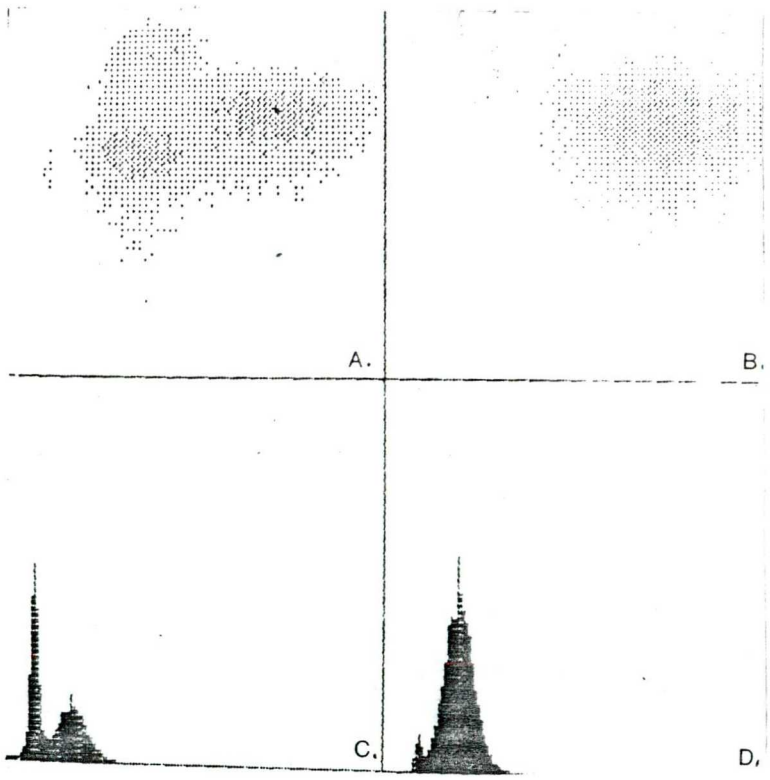
A táblázatban a hybridomák ellenanyagaival reagáló sejtek %-os arányát tüntettük fel.

Az 3.2.1. ábra bal felsõ négyzetében (3.2.1/A ábra) vizsgált csirke perifériás vérbõl készült sejtszuszpenzió morphológiai jellemzõinek megfelelelõ megoszlás látható: a vízszintes tengely a sejt - fényelnyelõ képességével arányos - átmérõje, a függõlegesen pedig a cytoplasma granuláltságának megfelelõ fényszóró képesség láthatók, a kettõ együtt pedig a sejtek méret és granuláltság szerinti eloszlását határozza meg. A nagy méretû, nagy granuláltságú populáció a granulocytáknak felel meg, (a kép jobb felsõ sarkában elhelyezkedõ sejtek) A jobboldali felsõ képen (3.2.1/B. ábra) ugyanez a sejtszuszpenzió látható, 1C3 ellenanyaggal való jelölés után. Az indirekt immunfluoreszcenciás festés FITC-cel jelölt egér IgG ellenes ellenanyaggal történt. Az ábrán csak a festõdött sejtek eloszlása látható. Az ábra alsó részén elhelyezkedõ két négyzetben (3.2.1/C. ábra és 3.2.1/D. ábra) a sejtek eloszlási görbéjét is megadtuk, tehát az adott sejtpopuláció összes sejthez viszonyított arányát. A 3.2.1/D ábra szerint a festõdött sejtek szinte teljesen egy populációból kerültek ki, mégpedig a granulocyták közül. A 3.2.2. ábra ennek a kinagyított, statisztikai adatokkal is ellátott képe. Látható, hogy az eloszlási görbe 12049 sejt adatából lett megszerkesztve, a digitalizáló összesen 1024 csatornára bontotta az adatokat és az eloszlási görbe meredekségébõl számítva a csúcs alatti területhez tartozik a fluoreszkáló sejtek 95.6%-a. Ez azt is jelenti, hogy gyakorlatilag a granulocyta frakcióba tartozó összes sejt jelölõdött az 1C3 ellenanyaggal.

A 3.2.3. ábra a 2C4 ellenanyag cytofluorometriás adatait tartalmazza. A 3.2.3/A és a C ábrák mutatják, hogy az ellenanyag a granulocytákon kívül más sejtekkel is reagál. A

3.2.1 ábra

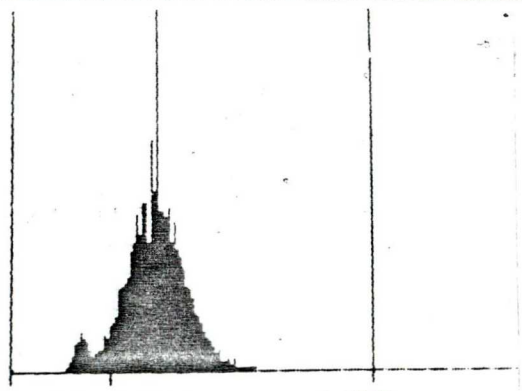
Az 1C3 monoklonális ellenanyaggal reagáló sejtek eloszlása a csirke perifériás vér leukocyták között cytofluorometriás módszerrel tesztelve



A vizsgált sejtek közül csak a granulocyták reagáltak az 1C3 ellenanyaggal

3.2.2. ábra

Az 1C3 monoklonális ellenanyaggal reagáló sejtek eloszlása a csirke perifériás vér leukocyták között cytofluorometriás módszerrel tesztelve



H4:1P 1024 LGFL
03JUL85.004040

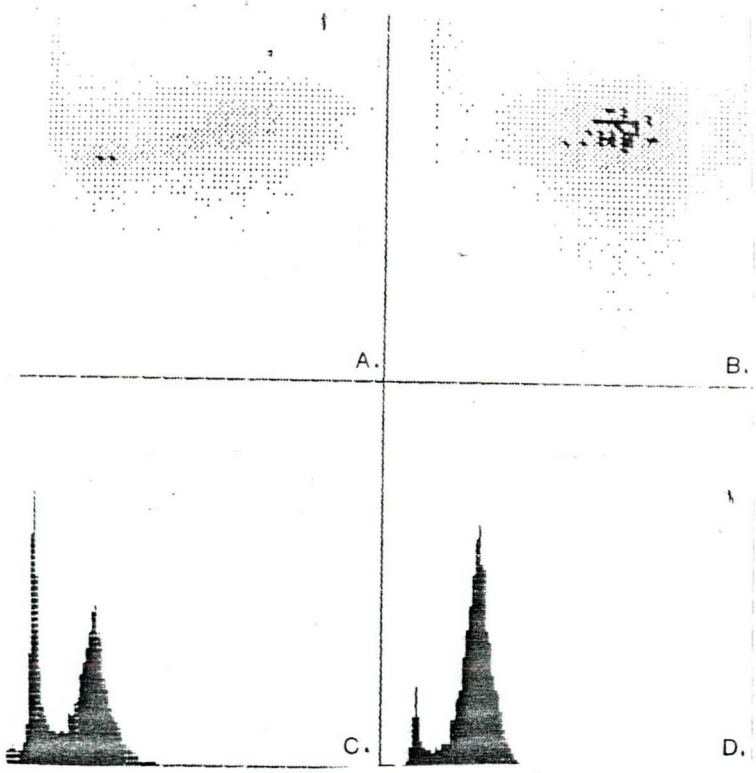
X-VALUES

A WINDOW LOW=	35
A WINDOW HI=	122
B WINDOW LOW=	0
B WINDOW HI=	255
X-AXIS LOW	33
X-AXIS HI	64
MEAN	233.39
S D	29.85
FPCV	12.79
HPCV	0.66
SKEWNESS	1.97
KURTOSIS	9.72
% =	47.59
PEAK AREA	5735
PEAK CHANNEL	224
HIST TOTAL=	12049

A granulocyták 95%-a reagált az 1C3 ellenanyaggal.

3.2.3. ábra

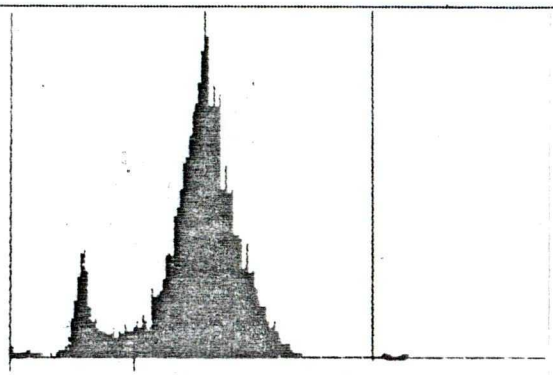
A 2C4 monoklonális ellenanyaggal reagáló sejtek eloszlása a csirke perifériás vér leukocyták között cytofluorometriás módszerrel tesztelve



A granulocyták mellet más sejtek (B sejtek) is reagálnak a 2C4 ellenanyaggal.

3.2.4. ábra

Az 2C4 monoklonális ellenanyaggal reagáló sejtek eloszlása a csirke perifériás vér leukocyták között cytofluorometriás módszerrel tesztelve



H4:1P 1024 LGFL
01JUL85.003040

X-VALUES

A WINDOW LOW=	42
A WINDOW HI=	122
B WINDOW LOW=	0
B WINDOW HI=	255
X-AXIS LOW	1
X-AXIS HI	64
MEAN	297.59
S D	28.37
FPOV	9.53
HPOV	4.50
SKEWNESS	1.28
KURTOSIS	5.20
% =	46.49
PEAK AREA	14697
PEAK CHANNEL	269
HIST TOTAL=	31607

A granulocyták 93%-a reagált a 2C4 ellenanyaggal.

statisztikát is bemutató 3.2.4. ábra összesen 31607 (ezek közül 14697 a granulocyta frakcióhoz tartozik) sejt adatai alapján készült. A granulocyta frakcióba tartozó sejtek 93%-a reagál ezzel az ellenanyaggal.

Hasonló módon meghatározva az 1C2 ellenanyag a granulocyta morphologiájú sejtek 50%-val reagált.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az 1C3 ellenanyag granulocyta specifikus, a 2C4 granulocytákon kívül más sejtekkel - valószínüleg B-sejtekkel is - reagál, az 1C2 a granulocyták 50%-ához képes kötödni, míg a 2C5 ellenanyag thrombocyta specifikus.

Az ellenanyagok complementkötö képességének vizsgálata

Ha a sejteket complementkötésre képes monoklonális ellenanyagokkal és ezt követöen complementtel kezeljük, akkor az ellenanyaggal reagáló (tehát a megfelelö antigéneket hordozó) sejteket el tudjuk pusztítani. Ha az ellenanyag nem complementkötö, akkor egy második ellenanyaggal - a mi esetünkben nyúlban termelt egér Ig ellenes ellenanyaggal - való kezelés után lehet a complement dependens cytotoxicitási reakciót végrehajtani. Az elpusztult sejtek vitális festéssel (pl. tripánkék festék kizárásos módszerrel) kimutathatók.

Ennek a vizsgálatnak az eredményeit tüntettük fel a 3.2.6. táblázatban.

3.2.6.táblázat.

A csirkesejtek ellen termelt hybridomák tesztelése complement dependens cytotoxicitási módszerrel.

Hybridoma	Perifériás leukocyták %-a
1C3	20
2C4	20
2C5	35 i
2B1	15
1C2	15
1C1	0
B2	15
B3	30
1B3	25
1B4	0
1D3	30
2A1	25
1A6	0
1C4	0
1D5	0
1/3	0
1/6	5
1/9	0
1/17	0
1/22	0
1/24	5
2/2	0
2/12	10
2/13	0

A táblázatban a hybridomák ellenanyagaival reagáló perifériás leukocyták %-os arányát tüntettük fel.

i= indirekt complement dependens cytotoxicitási teszt

Néhány monoklonális ellenanyagunk szubtípusának tesztelése

ELISA módszerrel néhány monoklonális ellenanyagunk immunglobulin osztályba való tartozását is meghatároztuk. Az eredményeket a 3.2.7. táblázatban foglaltuk össze.

3.2.7. táblázat.

Monoklonális ellenanyagok immunglobulin szubtípusának meghatározása ELISA módszerrel

Hybridoma	Protein A kötő képesség	Anti-egér IgG1	Anti-egér IgG2a	Anti-egér IgG2b	Anti-egér IgM
1C3	+	-	+	-	-
2C4	+	-	-	+	-
2C5	-	+	-	-	-
2B1	+	-	-	+	-
1/9	-	+	-	-	-

3.2.4. Funkcionális vizsgálatok csirkesejtekkel reagáló monoklonális ellenanyagokkal

Annak eldöntésére, hogy egy bizonyos monoklonális ellenanyag a sejtek milyen szubpopulációjával reagál, elvileg két általános eljárás kínálkozott: a sejtek pozitív vagy negatív szelekciója. A negatív szelekció során az ellenanyaggal reagáló sejtek complement dependens cytotoxicitási reakcióval eliminálhatók a sejtszuszpenzióból (depléció), és ezután vizsgálható a megmaradt sejtek *in vitro* (vagy *in vivo*) funkciója. Egy-egy funkció kieséséből az ellenanyag sejtspecificitására lehet

következtetni. A pozitív szelekció során viszont az ellenanyaggal reagáló sejteket szeparáljuk és dúsítjuk fel, mintegy "felerősítve" ezzel az adott sejttípushoz tartózó funkcionális aktivitást a szuszpenzióban. A sejtek pozitív szelekciójára több módszer ismert. Ha az ellenanyagot egy szilárd hordozóhoz kötjük, (pl. vörösvértesthez vagy polisztirol gyöngyhöz) majd a megfelelő antigénre nézve pozitív sejtek "kikötődése" után a nem reagáló sejtek mosással eltávolíthatók. Egy másik eljáráshoz sejtszorter szükséges: a sejtszuszpenzióban lévő, az adott antigénre nézve pozitív sejtek reagálnak a monoklonális ellenanyaggal, majd egy következő lépésben már ezek az immunglobulint hordozó sejtek fluoreszcens festékkel jelölt anti-egér immunglobulinnal festhetők. A sejtszorterrel aztán a jelölődött sejtek kiválogathatók.

3.2.4.1. Ellenanyagaink hatása a csirke leukocyták természetes cytotoxikus aktivitására

Amint azt *Mándi* és mtsai. leírták (*Mándi* és mtsai., 1985) a csirkék NK effektor sejtjei granulocyták. Ezt a megfigyelést az általunk készített monoklonális ellenanyagokkal kapott eredmények is alátámasztották. Csirke perifériás vérből származó sejtek közül elimináltuk az egyes monoklonális ellenanyagainkkal reagáló sejtpopulációkat és utána a maradék sejttel 4 órás ^{51}Cr-release tesztet végeztünk, amelyben a target az LSCC-H32 sejtvonal volt. Minden esetben volt csak complementtel, és csak ellenanyaggal kezelt kontroll minta is. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért ezeken az ábrákon nem tüntettük fel a csak ellenanyaggal kezelt kontrollokat, mivel ezek egy kivételével - erről az ellenanyagról a későbbiekben részletesen fogunk még

szólni - nem különböztek szignifikánsan a kezeletelen sejtszuszpenzióktól, illetve a velük kapott cytotoxicitási értékektől.

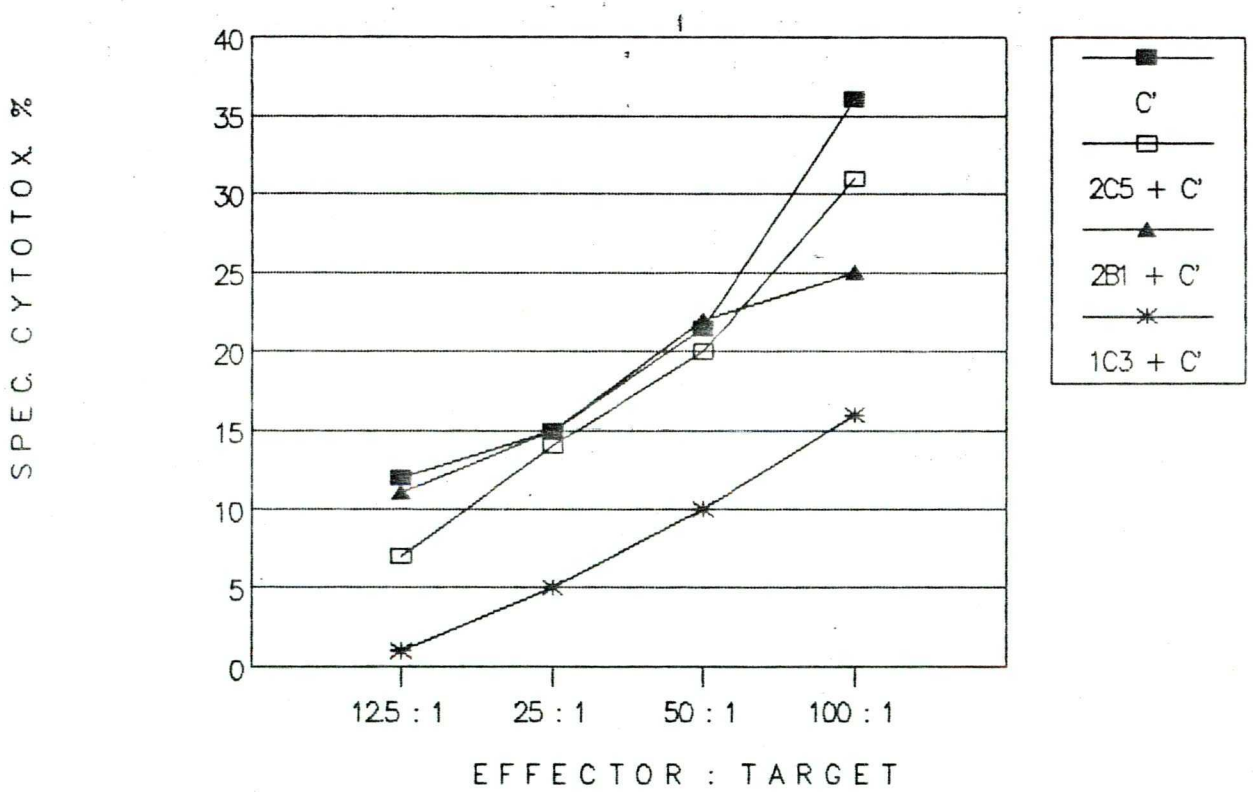
A 3.2.5.ábrán látható, hogy a kontroll sejtszuszpenzió még az 12.5 : 1 -es effektor : target arány mellett is szignifikáns természetes cytotoxikus aktivitással bír, a 100 : 1 arány mellet pedig a targetsejtek több mint 35%-a elpusztult. A granulocyta specifikus 1C3 ellenanyaggal végzett depléció azonban drasztikusan csökkentette a szuszpenzió cytotoxikus aktivitását. 100 : 1-es keverési arány mellett mindössze 17% volt a specifikus krómfelszabadulás, míg a legalacsonyabb effektor : target arány mellett már gyakorlatilag egyáltalán nem volt lízis.

Ugyanekkor a thrombocytaspecifikus 2C5-ös ellenanyaggal történt depléció egyáltalán nem befolyásolta a szuszpenzió NK aktivitását. Ezzel megegyező hatású, illetve "hatástalanságú" a monocytákkal, *Bursa Fabricii* sejtekkel és perifériás B lymphocytákkal reagáló 2B1 ellenanyaggal és complementtel történt kezelés.

A 3.2.6. ábrán az előző ábrán is szereplő, granulocyta-specifikus és NK aktivitás gátló hatású 1C3 mellett további ellenanyagok tesztelésének erdményei láthatók. Igen erős NK aktivitást gátló hatást sikerült kimutatnunk a 2C4 ellenanyaggal végzett depléciót követően is, amely a korábbi vizsgálatok tanúsága szerint Fabricius-féle tömlő és B sejtek mellett elsősorban a granulocytákkal képes reagálni. Ugyancsak szignifikáns NK aktivitást csökkentő hatásúak voltak a B2 és a B3 jelű monoklonális ellenanyagok, amelyek a granulocyta frakció sejtjeinek 50-, illetve 49%-val reagáltak (3.2.2. táblázat). Ezeken kívül vizsgáltuk még az 1C2 és a 2A1 ellenanyagokkal történő depléció hatását is - amelyek szintén reagáltak

3.2.5. ábra

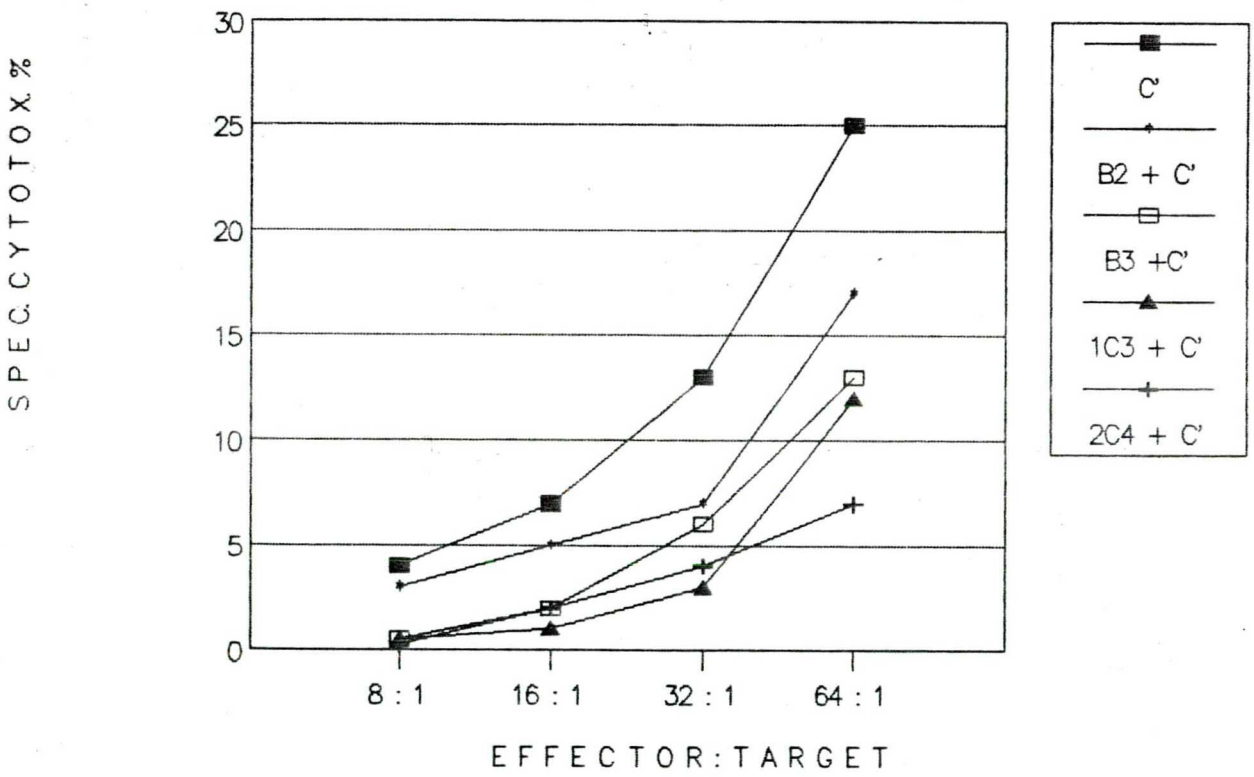
Monoklonális ellenanyagok és complement kezelés hatása a csirke leukocyták NK aktivitására



A targetsejt: LSCC H-32, a cytotoxicitás mérése 4 órás ^{51}Cr release tesztben történt.

3.2.6. ábra

Monoklonális ellenanyagok és complement kezelés hatása a csirke leukocyták NK aktivitására



A targetsejt: LSCC H-32, a cytotoxicitás mérése 4 órás ^{51}Cr release tesztben történt.

a granulocytákkal (3.2.2. táblázat) - és az eredmények szerint ez a két ellenanyag is képes csökkenteni a csirkék perifériás véréből származó leukocyták szuszpenziójában megfigyelhető NK aktivitást (itt nem ismertetett adatok).

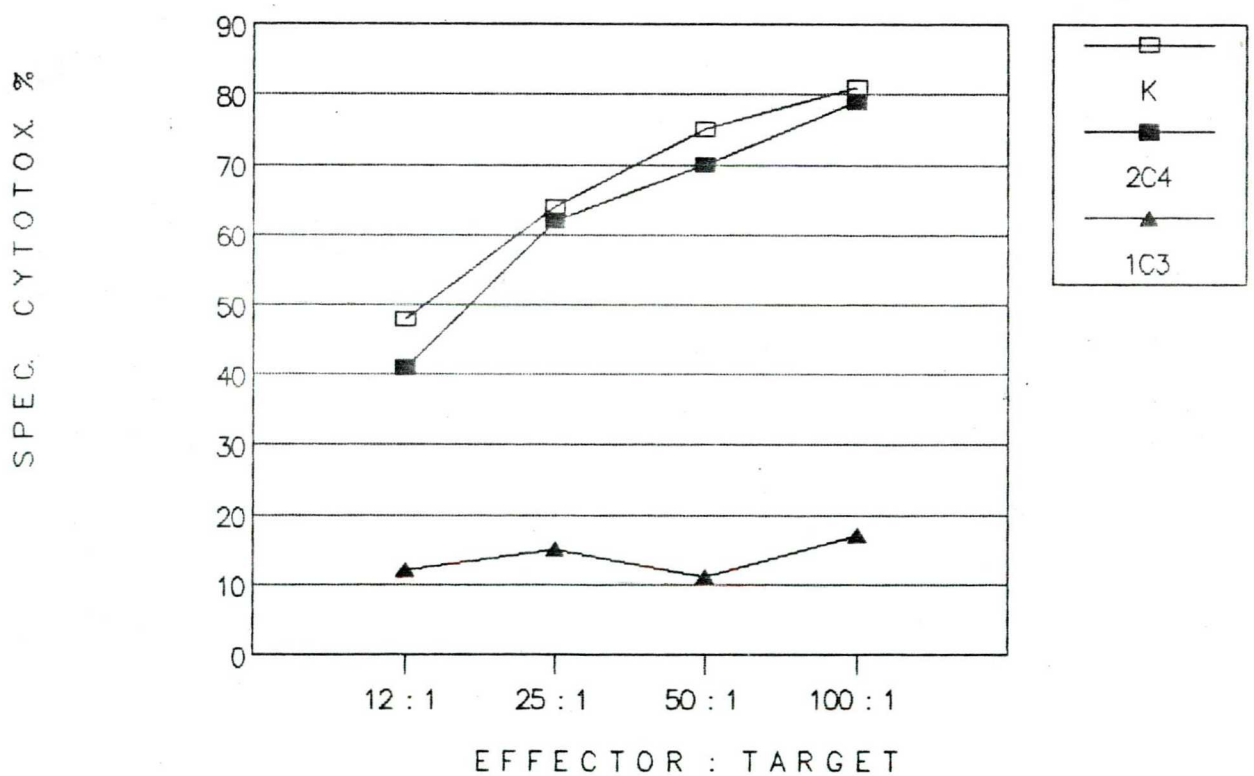
A korábbiakban már utaltunk arra, hogy az egyik ellenanyagunk complement kezelés nélkül is képes gátolni az NK aktivitást. A 3.2.7. ábrán foglaltuk össze az erre vonatkozó eredményeket. Míg a kezeletlen kontroll szuszpenzió, valamint a 2C4 ellenanyaggal kezelt szuszpenzió is ebben a reprezentatív kísérletben a 100 : 1-es keverési arány mellett csaknem 80%-os specifikus lízist eredményeztek, (azaz a 2C4-es ellenanyag complement nélkül semmiféle NK aktivitást gátló hatással nem rendelkezik) addig az 1C3-jelű monoklonális ellenanyag önmagában, complement hozzáadása nélkül is 10%-osra csökkentette a specifikus ^{51}Cr-release-t, azaz az NK aktivitást. Ezt a megfigyelésünket igen fontosnak éreztük, ezért a későbbiekben ezeket a vizsgálatainkat kiterjesztettük. Munkánkban a következő közbeeső lépés az ellenanyagainknak az ADCC reakcióra való hatásának vizsgálata volt.

3.2.4.2. Az ellenanyagfüggő sejtközvetítette cytotoxicitási reakció gátlása monoklonális ellenanyagokkal

Csirkékben az ADCC reakcióért többféle sejtpopuláció felelős. A legaktívabbaknak a granulocytákat, majd az LGL sejteket (large granular lymphcyte, azaz nagy granulált lymphocytákat) tartják, végül, bár gyengébb reaktivitással, de ugyancsak részt vesznek az ADCC reakciókban a monocyták is (*Béládi* és mtsai., 1984).

3.2.7. ábra

Monoklonális ellenanyagok hatása a csirke leukocyták NK aktivitására



A targetsejt: LSCC H-32, a cytotoxicitás mérése 4 órás ^{51}Cr release tesztben történt.

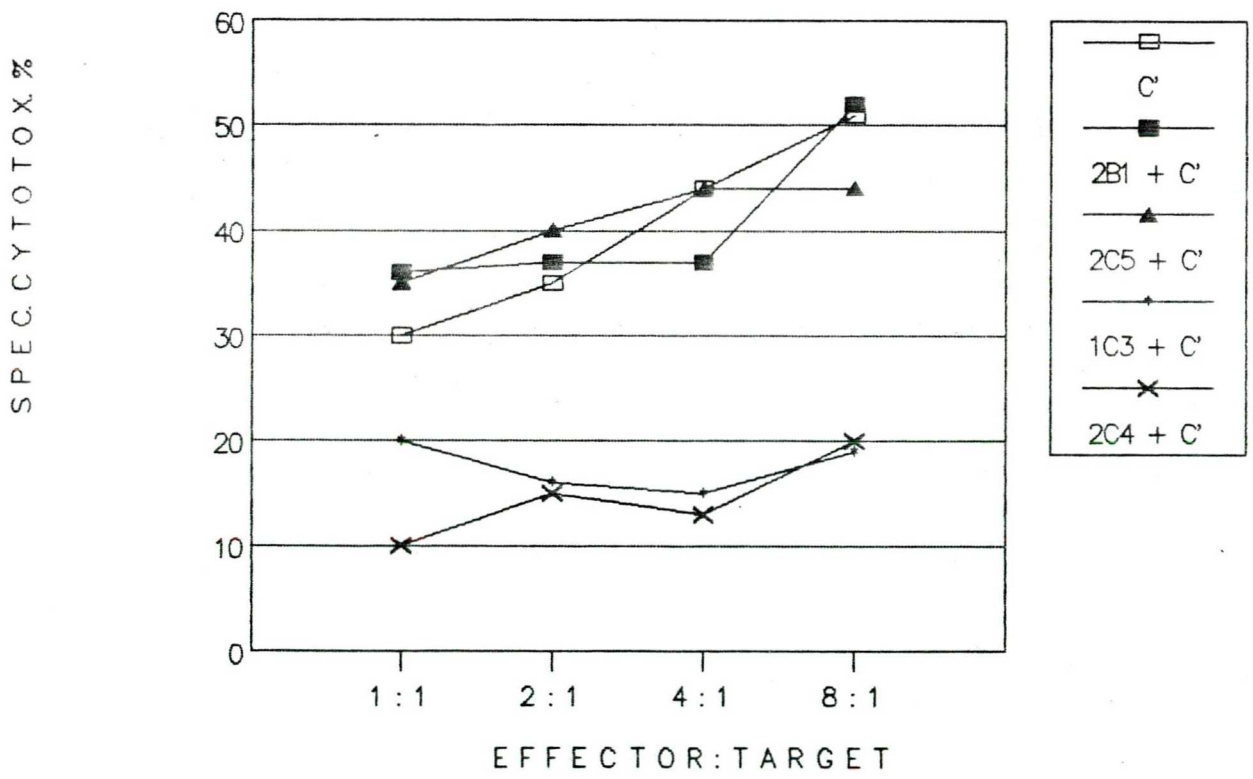
Mivel mi a granulocyták által mediált ADCC reakció befolyásolását szerettük volna vizsgálni, az első lépésben Perkoll sűrűséggrádiens centrifugálással tisztított granulocyta frakciót készítettünk, amely a morphologiai vizsgálatok tanúsága szerint 70-85% granulocytát tartalmazott. Az ADCC reakció méréséhez csirke haemolysinnel szenzibilizált, ^{51}Cr izotóppal jelölt birkavörösvértesteket használtunk, az effektor : target arányt pedig általában 8 : 1 és az 0.5 : 1 közt felező hígítású sorban alkalmaztuk.

A 3.2.8.ábrán a csak complementtel, illetve az ellenanyaggal és complementtel kezelt granulocyta szuszpenziók ADCC aktivitásait tüntettük fel az effektor : target arány függvényében. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért ez esetben sem tüntettük fel a kezeletlen kontrollok és a csak ellenanyaggal kezelt kontrollok ADCC raktivitását, amelyek nem különböztek a csak complementtel kezelt kontrolloktól. Látható, hogy a granulocytákkal reagáló 1C3, illetve a 2C4 ellenanyaggal végzett depléció jelentősen, mintegy a harmadára csökkentette a granulocyta szuszpenzió ADCC aktivitását, a két ellenanyaggal való kezelés között gyakorlatilag nem volt eltérés. Ilyen gátló hatása sem a monocytákkal, Fabricius-féle tömlő-, illetve B-sejtekkel reagáló 2B1 ellenanyagnak, sem a thrombocytákra specifikus 2C5 ellenanyagnak nem volt.

Amint azt az ellenanyagainknak az NK reakcióra kifejtett gátló hatásának vizsgálatakor már megfigyeltük, az 1C3 ellenanyag már önmagában, a complement hozzáadása nélkül is képes a cytotoxicitást gátolni. Ugyan ez volt megfigyelhető az ADCC reakció esetében is (3.2.9. ábra): a 4 : 1 -es effektor target arány mellett például a csak 1C3 ellenanyaggal kezelt szuszpen-

3.2.8. ábra

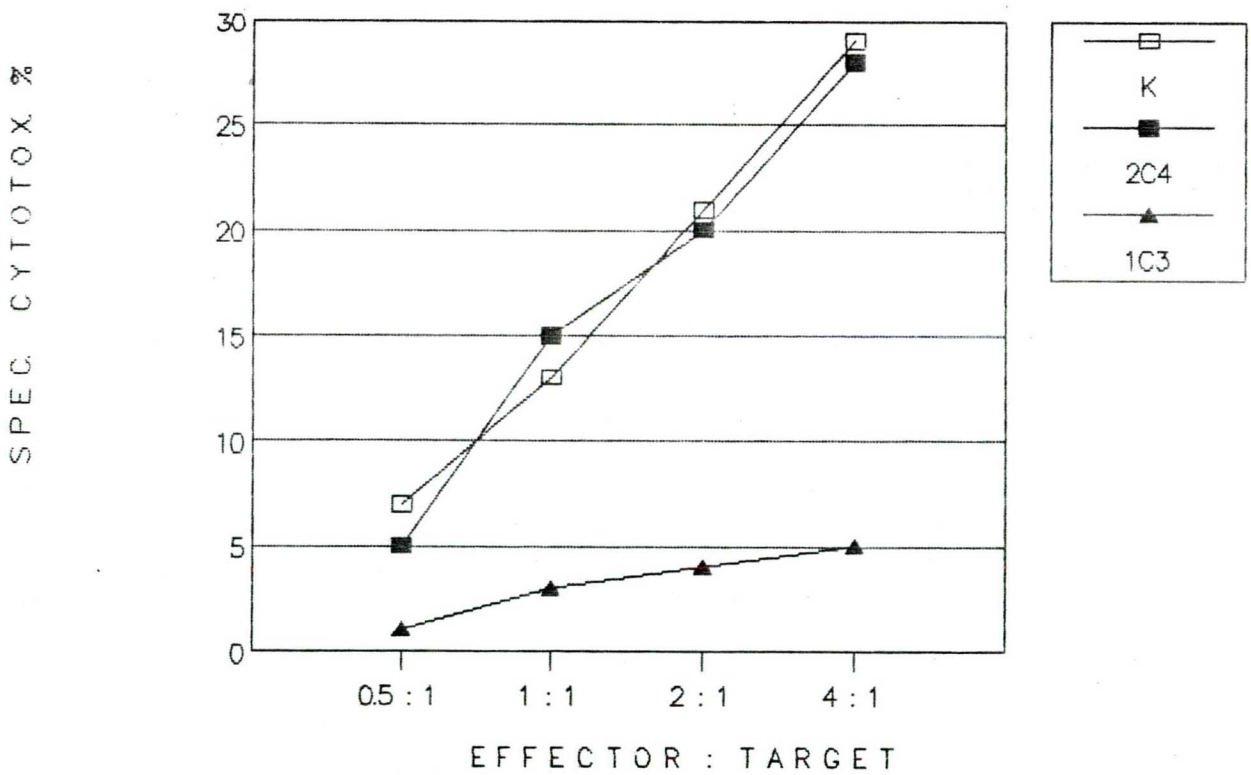
Monoklonális ellenanyagok és complement kezelés hatása a csirke granulocyták ADCC aktivitására



A targetsejt: csirke haemolizinnel kezelt birkavörösvértest, a cytotoxicitás mérése 16 órás ^{51}Cr release tesztben történt.

3.2.9. ábra

Monoklonális ellenanyagok hatása a csirke granulocyták ADCC aktivitására



A targetsejt: csirke haemolizinnel kezelt birkavörösvértest, a cytotoxicitás mérése 16 órás ^{51}Cr release tesztben történt.

zióban a kontroll cytotoxicitásának mindössze 25%-a volt kimutatható.

Mind az ADCC, mind az NK aktivitás gátlása esetén tripánkék festékkizárásos módszerrel ellenőriztük, hogy sem az 1C8, sem a többi vizsgált ellenanyag önmagában nem volt cytotoxikus.

Az ADCC reakciót adherenciás képességük alapján szeparált sejteken is megvizsgáltuk. Polystirol lemezen 1 óra hosszat inkubáltuk a csirke perifériás vérből származó sejteket. Giemsa festés alapján az így preparált sejtszuszpenzió 90%-a thrombocyta, a fennmaradó sejtek túlnyomó része monocyta és kissebb hányada pedig granulocyta, illetve lymphocyta. Eredményeink szerint a thrombocytáknak nincs ADCC aktivitásuk, amint az a 3.2.10. ábráról leolvasható. A thrombocyta specifikus 2C5 jelű ellenanyaggal és complementtel történő kezelés, azaz a thrombocyta depléció nem befolyásolta az ADCC reaktivitást.
A granulocyta specifikus 1C8 önmagában, vagy a complement kezeléssel kiegészítve is csak kevéssé, mindössze 10%-al csökkentette az ADCC reaktivitást. Ez az adat arra utal, hogy az adherens sejtek között csak kevés ADCC aktivitással rendelkező granulocyta van (3.2.10. ábra).

Szemben az előző két ellenanyaggal, a 2B1 ellenanyaggal és complementtel történt kezelés az összes ADCC reaktivitás közel 80%-át eliminálta (3.2.10. ábra). Mivel ez az ellenanyag a sejtszuszpenzió monocytáival reagált, így egyértelműen látható, hogy az 1 óra alatt a műanyag-felszínre kitapadó sejtek ADCC reaktivitásáért főleg a monocyták felelősek.

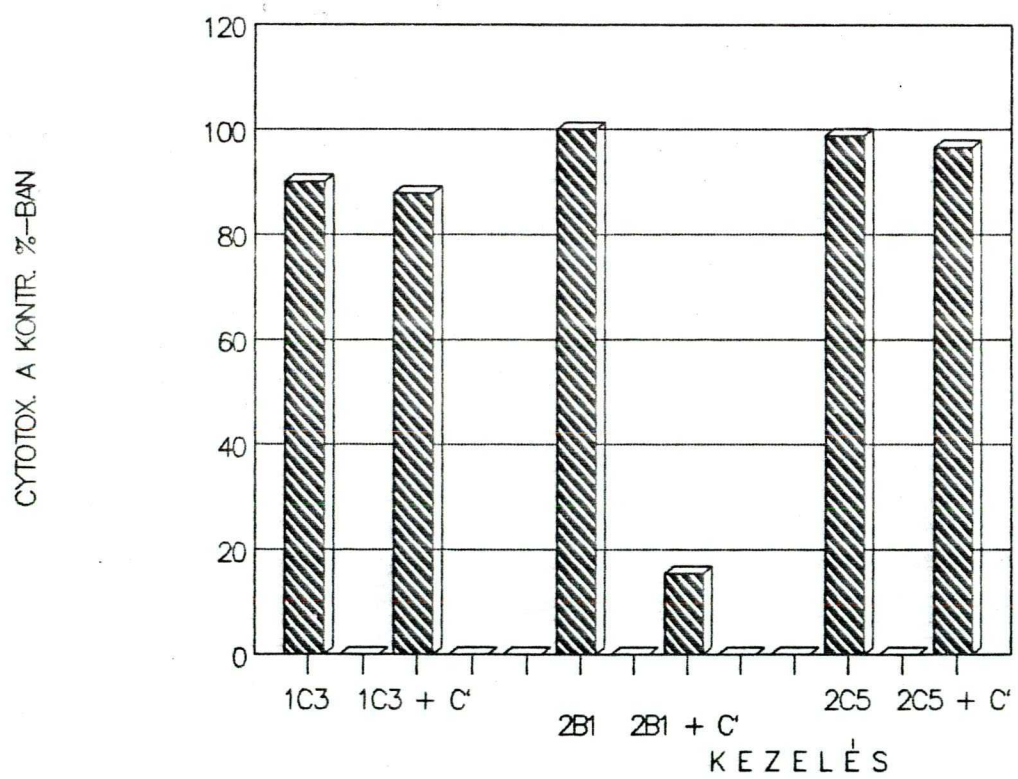
3.2.5. Az 1C3 ellenyag jellemzése

Az első logikus lépésnek az tűnt, hogy meg kellene határozni azt a sejtfelszíni struktúrát, az antigént, amellyel az ellenanyagunk reagál. A technikai adottságaink korlátozott volta miatt ezt a Turkui Egyetem Mikrobiológiai Intézetével közösen, kollaborációban szerettük volna megoldani, azonban eddig az antigéntisztítás többszöri próbálkozás után sem járt sikerrel.

A további vizsgálataink során megpróbáltuk meghatározni az 1C3 ellenanyag NK és ADCC reakció gátláshoz szükséges optimális koncentrációját, tehát azt a koncentrációt, amely mellet a maximális gátlóhatást tudjuk kiváltani. A cytotoxicitási értékeket a kontroll %-ban fejeztük ki. Az 1C3 ellenanyagot tartalmazó ascites "poolból" különböző hígításokat készítettünk. A

3.2.10. ábra

Monoklonális ellenanyagok, illetve monoklonális ellenanyagok és complementkezelés hatása a csirke perifériás vér adherens sejtjeinek ADCC aktivitására



Effektor : target arány 1 : 2, az adatokat a kontroll %-ában fejeztük ki. A targetsejt: csirke haemolizinnel szenzibilizált birkavörösvérsejt, a cytotoxicitás mérése 16 órás ^{51}Cr release tesztben történt.

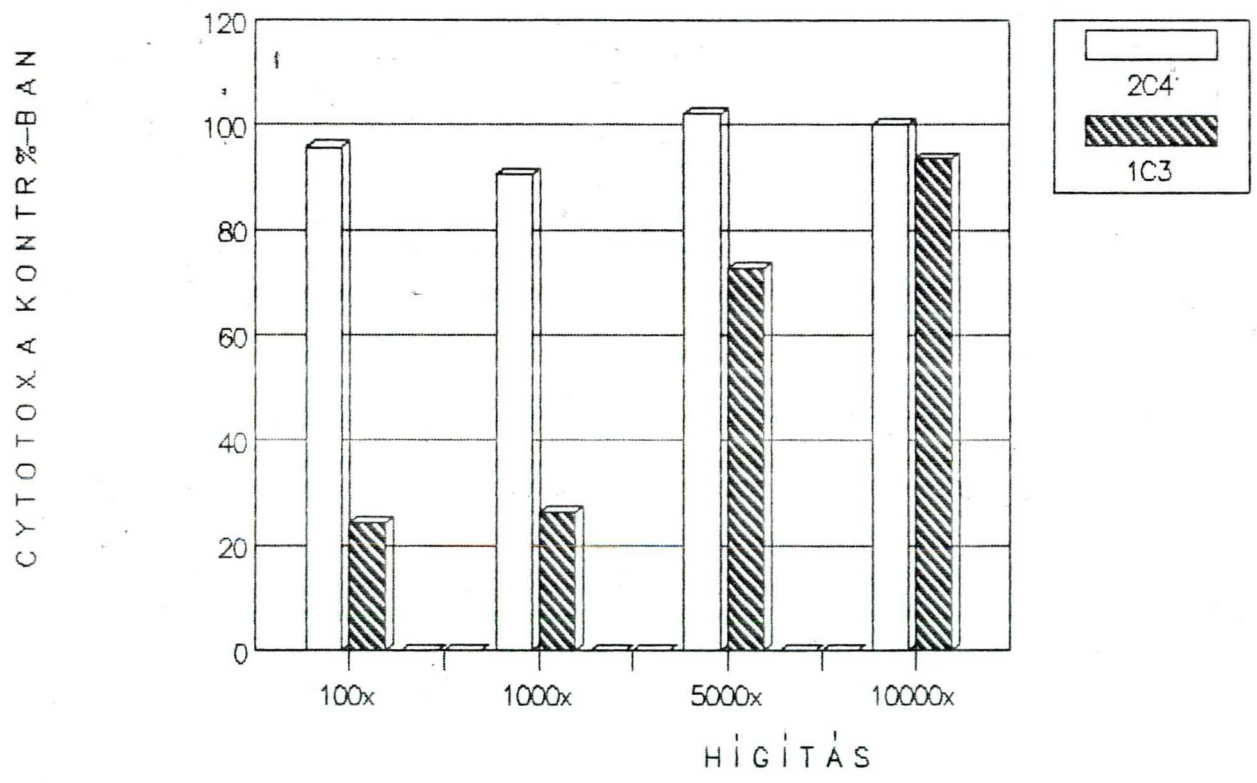
legnagyobb hígítás, a 10000- szeres, az NK aktivitást még nem befolyásolta (3.2.11. ábra) csak az 5000 szeres hígítás mellet tapasztaltunk gátló hatást. A maximális gátló hatás az 1000x-es ascites hígításnál volt elérhető. A gátlás azonban ez esetben sem volt teljes, a kontroll érték 20%-a maradt vissza. Az ADCC reakció azonban érzékenyebbnek bizonyult: már a 10000x-es hígítás mellet is a kontroll értéknek csak 50%-a volt mérhető (3.2.12. ábra), és ez az 5000 szeres hígításnál tovább csökkent. A reakció maximális gátlását (a normál kontroll 5%-át) azonban az NK reakciónál megfigyelthez hasonlóan 1:1000 ascites hígításnál értük el.

3.2.5.1. Ellenanyagaink EA rozetta képződést gátló hatása.

Azok a sejtek, amelyeknek Fc receptoruk van, az immunglobulinokkal opszonizált vörösvértestekkel finom precipitátumot (rozettát) képesek alkotni. Előkísérletben megbizonyosodtunk arról, hogy a nem opszonizált birka vvt-kel a csirke leukocyták önmagukban nem képesek rozettát képezni. A rozetta-képzéshez csirke haemolysinnel kezelt birkavörösvértesteket használtunk és csirke perifériás vérből Ficoll-Uromiro grádienssen tisztított leukocytákat. Az ellenanyagaink rozettaképzést gátló aktivitását az azonos szuszpenzióból származó, kezeletlen kontroll %-ában fejeztük ki, tehát az ellenanyagokkal nem kezelt szuszpenzióban rozettát képző sejteket tekintettük 100%-nak. Az eredményeket, amelyek két független kísérlet átlagát reprezentálják, a 3.2.8. táblázatban foglaltuk össze.

3.2.11. ábra

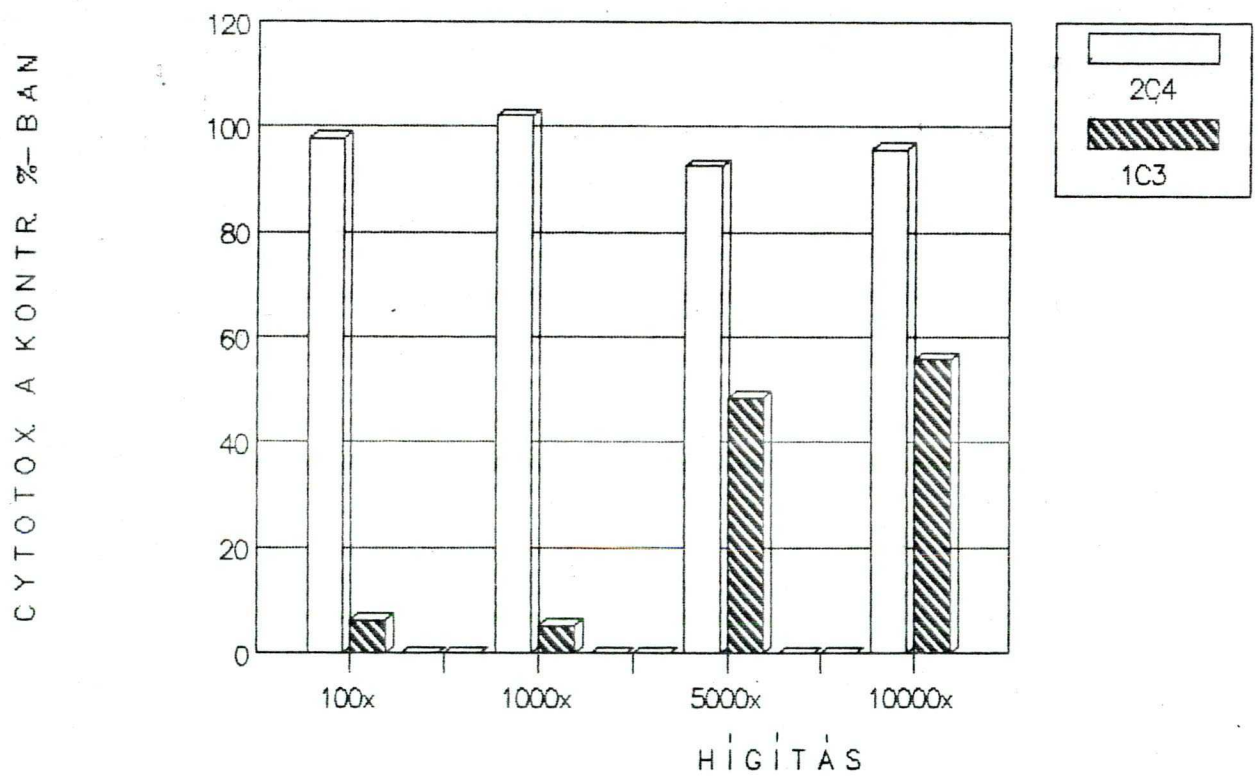
Az 1C3, illetve a 2C4 monoklonális ellenanyagok különböző koncentrációinak hatása a csirke granulocyták NK aktivitására



Effektor : target arány 10 : 1, az adatokat a kontroll %-ában fejeztük ki. A targetsejt: LSCC H-32, a cytotoxicitás mérése 4 órás ^{51}Cr release tesztben történt.

3.2.12. ábra

Az 1C3, illetve a 2C4 monoklonális ellenanyagok különböző koncentrációinak hatása a csirke granulocyták ADCC aktivitására



Effektor : target arány 10 : 1, az adatokat a kontroll %-ában fejeztük ki. A targetsejt: csirke haemolysinnel szenzibilizált birkavörösvértest, a cytotoxicitás mérése 16 órás ^{51}Cr release tesztben történt.

3.2.8. táblázat.

Monoklonális ellenanyagok hatása csirke perifériás vérből tisztított leukocyták EA rozetta képzésére.

Hybridoma	EA rozetta képző sejtek kezeletlen kontroll %-ában kifejezve
1C3	29
2C4	117
1C2	73
1C1	95
2C5	102
2B1	79
1/9	85

Hasonlóan az NK és az ADCC reakciók esetén megfigyeltekhez, egyedül az 1C3 ellenanyag volt képes ezt a reakciót is gátolni, hiszen ezzel az ellenanyaggal való kezelést követően a rozetták aránya közel negyedére csökkent, míg a többi esetben változatlan, vagy közel változatlan volt a rozetta-képző sejtek aránya.

3.2.5.2. A tripszinnel kezelt csirke granulocyták nem reagálnak az 1C3 monoklonális ellenanyaggal

Épp a fentiek miatt, mi is ellenőriztük, vajon az 1C3 ellenanyaggal reagáló antigén tripszin szenzitív, vagy rezisztens. A hagyományos immunfluoreszcenciás tesztelés előtt tripszinnel kezeltük a perifériás vérből származó leukocyta-szuszpenziót. Míg a kezeletlen sejtek 38% reagált az 1C3 ellenanyag-

gal, addig a tripszinnel kezelt sejtek közül mindössze 9% (3.2.9. táblázat),

3.2.9. táblázat.

A monoklonális ellenanyagokkal reagáló antigének érzékenysége tripszinnel való kezeléssel szemben.

Hybridoma	A reagáló sejtek a kezelés	
	előtt	után
1C3	38	9
2C4	25	22
1C2	10	13
2C5	40	36
2B1	13	13
1/9	14	17

tehát az 1C3 ellenanyaggal reagáló struktúra tripszin szenzitív. Ezzel párhuzamosan a 2C4, az 1C2, a 2C5, a 2B1, és az 1/9 ellenanyagok által felismert antigének tripszin-érzékenységét is megvizsgáltuk, és az találtuk, hogy valamennyi rezisztens a tripszinnel való kezelésre. (3.2.9. táblázat)

3.2.5.3. Az 1C3 ellenanyag hatása az effektor-target összekapcsoló-dására az NK reakcióban

Ha az 1C3 ellenanyag gátolja az NK és az ADCC reakciót is, akkor ezt a gátló hatást vajon a reakció melyik fázisában fejti ki? Az első lépés lehet például az is, hogy az ellenanyag képes az effektor és a target sejtek kapcsolódását gátolni. A NK reakció tesztelésekor a target sejtnek LSCC-H32 sejteket használtunk. Azonban amikor az 1C3 ellenanyaggal kezelt és FITC

-cel jelölt sejteket inkubáltunk együtt a targetsejtekkel, jól látható volt, hogy az összekapcsolódás megtörtént.

3.2.6. A monoklonális ellenanyagaink hatása a csirke leukocyták vírus indukálta interferon termelésére

Intézetünkben korábbi vizsgálatok utaltak arra, hogy a csirkék perifériás leukocytái közül esetleg a Fabricius-féle tömlő eredetű sejtek (B-lymphocyták) rendelkeznek vírussal indukálható interferon termelő képességgel, ugyanis a Fabricius-féle tömlő eredetű sejtekkel szemben termelt poliklonális savóval és complement kezeléssel fel lehetett függeszteni a sejtszuszpenziók interferontermelő képességét, míg a thymocyták ellen termelt savók és complement kezelés hatástalannak bizonyult (*Pusztai* R., személyes közlés). Az előzőekben már ismertettük, hogy egyes monoklonális ellenanyagaink (2B1, 2C4, 1/9, 1/6, 2/12) reagálnak Fabricius-féle tömlő-, illetve B sejtekkel. Ez módott adott arra, hogy kísérletesen eldönthessük, vajon a csirkék B-lymphocytái valóban rendelkeznek-e interferontermelő képességgel.

A perifériás vérből származó sejtekben interferon termelés indukciójához human, 12-es típusú adenovírust használtunk, majd a 48 órás inkubációt követően összegyűjtött felülúszókból interferon titrálást végeztünk. A 3.2.10. táblázatban összefoglalt adatokat általában két (vagy több) vizsgálat átlagát jelentik, kivéve a (*) jelzetteket, amelyeket egy titrálás alapján számoltunk ki. Egyértelműen látható, hogy egy kivétellel, sem az ellenanyagokkal való kezelés, sem az EA+C'-vel történt kezelés nem gátolta az interferon termelődését.

Egyetlen esetben volt jelentős, teljes gátlás az interferon termelődésében, akkor amikor a 2B1 ellenanyaggal és complement kezeléssel végeztünk depléciót.

A 2B1 ellenanyagról eredetileg annyit tudtunk, hogy granulocytákkal nem, a bursa sejtek 100%-val reagál. Ezek alapján arra lehetett következtetni, hogy a 2B1 a perifériás vérben csak a B lymphocytákhoz kötődik, így az interferon termelő sejtek a B lymphocyták lehetnének. Részben ellentmond ennek az a megfigyelés, hogy a 2C4 ellenanyag, amely granulocyták mellet Fabricius-féle tömlő eredetű sejtekkel is reagál, egyáltalán nem gátolta az interferon termelődését (3.2.10. táblázat): ha az interferon termeléséért a B sejtek lennének felelősek, akkor a 2C4 + C' kezelésnek is fel kellet volna függesztenie az interferon termelődését. Ez azonban nem következett be, így kizárásos alapon már csak egy sejtféleség, a monocyta maradt, amellyel a 2B1 ellenanyagunk reagálhat.

3.2.7. A 2B1 jelű monoklonális ellenanyag jellemzése

Az előzőekben már leírtuk, hogy a 2B1 ellenanyaggal és complement kezléssel végzett depléció csökkentette a plasztik adherens sejtek ADCC reaktivitását és ezt csak a monocyták eliminációja alapján tudtuk értelmezni. További adatot szolgáltatott az a megfigyelésünk, hogy a 2B1 tripszin rezisztens struktúrával reagál és nincs hatása a perifériás leukocyták EA rozetta képzésére. Mivel a vírus indukálta interferon termeléséért felelős sejtekkel is reagál, fontosnak tartottuk, hogy további adatokat szerezzünk erről az ellenanyagunkról.

3.2.10. táblázat.

A monoklonális ellenanyagokkal történt kezelések hatása a csirke perifériás vérből származó leukocyták vírus indukálta interferon termelésére.

Kezelések	IFN titer %	
kezeletlen kontroll	100	
csak C'kezelt kontroll	97	
2B1	114	
2B1 + C'	>0.1	
2C4	42	
2C4 + C'	235	(*)
1C3	96	
1C3 + C'	91	
2C5	155	
2C5 + C'	165	
1/9	95	(*)
1/9 + C'	257	(*)
2/12	121	(*)
2/12 + C'	233	(*)

Az adatok általában két vizsgálat átlagát jelentik, kivéve a (*) jelzetteket, amelyeket egy titrálás alapján számoltuk ki.

3.2.7.1. A 2B1 monoklonális ellenanyag + C' kezelés hatása a Jerne-féle haemolitikus plakkot képző (immunglobulin termelő) sejtekre

10^8 birkavörösvértest *iv.* oltásával csirkéket szenzibilizáltunk. Az oltást követő 3. napon a csirkék aseptikusan eltávolított lépéből szuszpenziót készítettünk. A 10^7 sejt/ml sejtkoncentrációjúra beállított szuszpenziót monoklonális ellenanyaggal, illetve ellenanyaggal és complementtel kezeltük. Ezt követően Jerne-féle haemolitikus plakk assayben hasonlítottuk össze a kezelt és a kezeletlen szuszpenziók plakk-képző aktivitását. A táblázatból kitűnik, hogy egyedül a 2B1 ellenanyaggal végzett depléció volt képes csökkenteni a plakk-képző sejtek számát. A 2C4 ellenanyag, amely az immunfluoreszcenciás vizsgálatokban kapott eredmények alapján a Fabricius-féle tömlő sejtek kb. 20%-val reagál, a plakk-képző sejtek számát nem befolyásolta, tehát biztos, hogy nem az immunglobulint szekretáló B-sejteket "ismeri" fel (3.2.11. táblázat).

3.2.7.2. A 2B1 monoklonális ellenanyag és complement kezelés hatása a nemspecifikus észtáráz pozitiv sejtekre

Mivel a korábbi tesztelések során a 2B1 jelű ellenanyag + C'kezelés a plasztikadherens sejtek ADCC reakcióját képes volt gátolni, feltehetően a monocyták elpusztítása révén, a továbbiakban bizonyítani szerettük volna, hogy ez az ellenanyag valóban reagál a monocytákkal.

3.2.11. táblázat.

Birka vvt-vel szenzibilizált és monoklonális ellenanyaggal és complementtel kezelt csirke lépsejtek haemolytikus plakk-képző aktivitása.

Kezelés	Haemolitikus plakkok száma	Haemolitikus plakkok kontroll%
kezeletlen	21	100
csak C' kezelt	24	114
2C4	24	114
2C4 + C'	18	75
2B1	20	83
2B1 + C'	1	8
1/6	17	81
1/6 + C'	22	104
2/12	24	114
2/12 + C'	25	119
1/9	32	152
1/9 + C'	25	119

A plakkok számát $5x10^5$ lépsejtre számítottuk.

Csirke perifériás vérből tisztított leukocytákat 2B1 ellenanyaggal és complementtel kezeltünk. A szuszpenziót a mosások után mikroszkópiás célra használt, üvegből készült, steril fedőlemezen 37°C-on történő 16 órányi inkubálás után a nem adherens sejteket óvatosan lemostuk, és a visszamaradt sejtek között meghatároztuk a nemspecifikus észteráz enzimre nézve pozitív sejtek gyakoriságát, illetve gyakoriságuk változását az ellenanyaggal nem kezelt kontroll szuszpenzióhoz képest.

A nemspecifikus észteráz pozitív sejtek festődésük és morphologiájuk alapján monocyták és macrophagok voltak. Adataink szerint csak a poliklonális Fabricius-féle tömlő sejt ellenes savó, valamint a monoklonális ellenanyagok közül a 2B1 reagál az adherens sejtek nemspesifikus észteráz pozitív frakciójával, így a complementtel való kezelés e két ellenanyag esetében jelentős észteráz pozitív sejt-depléciót eredményezett: a savó esetében a kezeletlen kontroll mindössze 10-, a 2B1 monoklonális ellenanyag esetében pedig a kontroll 15%-a maradt meg.

A 3.2.13. táblázat adatait három kísérlet eredményeit átlagolva nyertük. Ha az egyes kísérletben külön-külön megfigyeljük az interferon titereket, az látjuk, hogy különböző értékeket kaptunk. Azonban az interferon titerek jól korrelálnak az ellenanyag + C' kezelést követően a szuszpenzióban maradt nemspecifikus észteráz pozitív sejtek arányával (3.2.13. táblázat): ha több észteráz pozitív sejt maradt a szuszpenzióban, magasabb volt a mérhető interferon titer, alacsonyabb nemspecifikus észteráz pozitív sejtszám mellett, pedig az interferon titer alacsonyabb volt.

Szeged Könyvtár

3.2.12. táblázat.

A monoklonális ellenanyagok hatása a nemspecifikus észteráz pozitív sejtek gyakoriságára a csirke prifériás leukocyták üvegadherens sejtfrakciójában.

Kezelés	A pozitív sejtek %-os aránya
kezeletlen kontroll	100
csak complement kezelt	132
2B1	132
2B1 + C'	15
1C3	NA
1C3 + C'	86
2C4	117
2C4 + C'	119
1/9	105
1/9 + C'	121
2/12	121
2/12 + C'	133
1/24	126
1/24 + C'	135
anti-csirke thymocyta savó (α-csTS)	NA
α-csTS + C'	133
anti-csirke Bursa savó (α-csBS)	NA
α-csBS + C'	10

NA= nincs adat

3.2.13. táblázat

A 2B1 ellenanyag és complement kezelés után visszamaradt nemspecifikus észteráz pozitív adherens sejtek százalékos részaránya és a felülúszóik interferontartalma.

Kezelés	%°	IFN titere (NE/ml)
1. kísérlet		
kezeletlen	28	4526
csak C'kezelt	28	3863
2B1 + C'kezelt	3	35
2. kísérlet		
kezeletlen	57	30484
csak C'kezelt	71	43116
2B1 + C'kezelt	18	1475
3. kísérlet		
kezeletlen	26	2241
csak C'kezelt	33	1856
2B1 + C'kezelt	<1	<29

A táblázatban három kísérlet adatait foglaltuk össze.

o = a nemspecifikus észteráz pozitív sejtek %-os aránya az adherens sejtek között.

4. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

4.1. Monoklonális ellenanyagok recombináns humán α-interferon ellen

A recombináns α-interferonnal immunizált egerek lépsejtjeinek a myelomasejtekkel való fúziójából összesen 12 olyan hybridomát izoláltunk, amelyek ELISA tesztben egyértelmûen reagáltak az interferon-preparátummal. Azt azonban, hogy ezek valóban az interferonnal reagálnak, nem pedig a nagy tisztaságú interferon-preparátumokban is óhatatlanul jelen levő (még ha minimális mennyiségben is) bakteriális eredetû szennyező anyaggal, illetve az interferon stabilizálását elősegítő "töltelékfehérjével" (BSA-val), csak funkcionális vizsgálatok alapján tudtuk eldönteni. Az egerek immunizálását követően végzett kísérletből már tudtuk, hogy az immunizálás hatására interferon-neutralizáló ellenanyagok is megjelennek a savóban.

A 12 hybridoma közül összesen 6 esetében találtunk humán αA-interferont neutralizáló aktivitást is (3.1.2. fejezet). A későbbi tenyésztés és klónozások során azonban kettőt elveszítettünk (II/A5, II/D5) egynek pedig valószínûleg megszûnt az ellenanyag termelő képessége, mivel a reklónozása minden igyekezetünk ellenére eredménytelen maradt. Ez utóbbi oka a hybridoma genetika anyagának,, illetve a hybridizációval "összeállt" kromoszómakészletének instabilitása lehetett, ami a hybridizációkat követően viszonylag gyakori jelenség (*Hadas* és mtsai., 1978). A maradék három hybridoma közül kettő esetében igen magas interferon-neutralizáló aktivitást kaptunk (II/A1, IV/C5), a harmadik, a II/A2 jelû esetében szintén jól kimutatható volt az interferon-neutralizációs képesség, de a többinél

jóval alacsonyabb aktivitást találtunk. Igy összesen három, egyértelmûen interferonellenes ellenanyagunk maradt, bár nem zárható ki, hogy a fennmaradó 6, interferont nem-neutralizáló ellenanyag között is van még interferonnal reagáló ellenanyag. Ennek a kérdésnek az eldöntése további vizsgálatokat igényel. Azt, hogy egyes ellenanyagaink pontosan milyen módon gátolják az interferon aktivitását, nem tudjuk, azonban *Langford* szerint (*Langford* és mtsai., 1987) az ellenanyagok többféle módon neutralizálhatják az interferont:

- Az ellenanyag az interferon molekulának az interferon receptor által felismerendõ részéhez kötõdik és ily módon gátolja az interferon receptorhoz való kapcsolódását.

- Az ellenanyag az interferon molekulának olyan részéhez kapcsolódik, amely vitális fontosságú az interferon sejten belüli aktivitásához.

- Az ellenanyag az interferon molekulához való kötõdésével megváltoztatja annak tercier strukturáját, és/vagy flexibilitását és ily módon inaktiválja azt.

- Az ellenanyagok aggregátumot képeznek az interferonnal.

A negyedik lehetõség valószínûségét csökkenti, hogy a hybridomák által termelt ellenanyagok az IgG1-es alosztályba tartoznak. Ezek az ellenyanyagok viszont általában aránylag gyenge precipitációs képességûek (*Klein*, 1984).

Monoklonális ellenanyagokkal végzett vizsgálatok esetében megkerülhetetlen kérdés az ellenanyagok specificitása. Mi az egerek immunizálásához nagytisztaságú recombináns αA-interferont használtunk. Az irodalomból azonban ismert, hogy egyes monoklonális ellenanyagok képesek többféle interferonnal is reagálni. Például a *Berg* és munkatársai által (*Berg* és mtsai., 1984) elõállított LO-22 jelû, ellenanyag összesen 12 human α-

interferon szubtípussal reagál, sőt kimutatta, hogy a sertés leukocyta interferonhoz is kötődik. Ebből arra következtethetünk, hogy az ellenanyag egy, az evolúció során megőrződött közös epitóppal reagál az α-interferon molekulákon. Ellentétben a *Berg* és munkatársai által tesztelt ellenanyaggal, a mi ellenanyagainknak inteferon-neutralizáló aktivitása is volt, így mi az ellenanyagok specificitását az interferon-neutralizációs tesztekkel is összehasonlíthattuk.

Az általunk kifejlesztett α-interferon ellenes ellenanyagok közül kettő (IV/C5 és a II/A1) a természetes humán α-interferont csak kis mértékben volt képes semlegesíteni. Ez amellett szól, hogy a tesztelt ellenanyagaink az α-interferon szubtípusoknak csak viszonylag szűk körével reagáltak, hiszen a természetes interferon-preparátumok sok interferon szubtípust tartalmaznak.

Ha a kérdést részleteire bontva vizsgáljuk, akkor tudjuk, hogy ellenanyagaink a humán *β*-interferont nem neutralizálják (nem közölt adatok). Az α-interferon szubtípusok közül az αD szubtípus állt rendelkezésünkre. ELISA tesztben vizsgálva két ellenanyagunk reagált a human αD interferon készítménnyel (I/A1, IV/C5), azonban az interferon antivirális hatását gátló aktivitása egyik ellenanyagunknak sem volt. Ez azt is jelenti, hogy a IV/C5 jelű ellenanyagunk segítségével biztosan meg tudjuk különböztetni a human αA és a human αD interferon szubtípusokat is, hiszen a IV/C5-ös elenanyagunk az αA interferon antivirális hatását neutralizálni képes és ez az ellenanyag bizonyos mértékben alkalmas lehet magának az interferonmolekulának, illetve epitópjainak az interferon aktivitása szempontjából való vizsgálatára is.

Jól ismert dolog, hogy az interferon molekula természetes körülmények között rendkívül alacsony koncentrációban fordul elő (*Vilcek* és *Mayer*, 1984), sőt még az interferon termelési eljárások során használt kultúrákban is nagyon alacsony a koncentrációja (*Vilcek* és *Mayer*, 1984). Ez igen komoly nehézségeket jelent a kísérletekhez, illetve klinikai kipróbáláshoz/alkalmazáshoz szükséges, megfelelően nagy tisztaságú és nagy aktivitású interferon-preparátumok előállításában. A fentiek miatt igen fontosnak tartjuk azt az eredményünket, hogy az általunk előállított, α-interferonnal reagáló ellenanyagok közül egy affinitáskromatográfiára is alkalmas, segítségével nagytisztaságú interferon-preparátum nyerhető, sőt a tisztított interferon aktivitása is megmarad (3.1.5. fejezet).

4.2. Csirkesejtekkel reagáló monoklonális ellenanyagok

Intézetünkben hosszú idő óta folynak olyan kísérletek, melyek célja a szárnyasok, de elsősorban csirkék immunrendszerének vírusokkal szembeni válaszképességének, az immunválasz mechanizmusának, illetve az immunválasz interferonnal való modulálhatóságának vizsgálata. Már régen felmerült, hogy sokat segítene a további vizsgálatokban, ha a szokásos és klasszikus morphologiai, illetve hisztokémiai módszereken túl, más módszerekkel is definiálni lehetne a csirkék immunrendszerét alkotó sejtpopulációkat. Ilyen "praktikus" okok vezettek aztán oda, hogy csirke leukocyták sejtfelszíni antigénjeivel szembeni monoklonális ellenanyagokat kezdtünk kifejleszteni.

Tekintettel arra, hogy az utóbbi időben a laboratóriumunk érdeklődésének középpontjába a csirke granulocyták kerültek,

mivel *Mándi* (*Mándi* és mtsai., 1985) megállapítása szerint - ellentétben az emlősökben megfigyeltekkel - a csirkékben az NK, illetve az ADCC reakciók (*Bálási* és mtsai., 1984) effektor sejtjei a granulocyta populációban találhatók. Az első és legsürgetőbb teendő egy granulocytákkal specifikusan reagáló ellenanyag előállítása volt, amely lehetővé tenné a granulocyták további, részletesebb vizsgálatát.

A sejtfúziókhoz az SP2/0, immunglobulint nem szekretáló myelomavonal állt rendelkezésünkre, amely H-2^d hisztokompatibilitási antigéneket hordoz. Immunizálásokhoz Balb/c (H-2d) egereket használtunk. Ez a választás lehetővé tette, hogy a későbbiekben a hybridomákat szingén rendszerben (Balb/c) *in vivo* is fenntarthassuk, ami egyúttal azt is jelentette, hogy a szekretált immunglobulint igen magas koncentrációban tartalmazó ascitesfolyadékot is termelhettünk. Az ascitesekben több százszor, esetenként több tízezerszer magasabb koncentrációban termelődnek az immunglobulinok, mint az *in vitro* sejttenyészetekben. Ezeket a megfontolásokat szemelőtt tartva perkollgrádiensen tisztított granulocyta szuszpenzióval, illetve a későbbiekben, amikor a B sejt ellenes hybridoma előállítása volt a cél Fabricius-féle tömlő sejtekkel - tehát antigénekkel "feldúsított" szuszpenzióval - immunizáltuk az egereinket. Mivel az első oltást követően a primer immunválasz során képződött ellenanyagok aránylag kis aviditású, főleg IgM típusú ellenanyagok, igen gyakran un. természetes ellenanyagok, amelyek oligosőt gyakran polyspecifikusak is lehetnek (Petrányi és mtsai., 1988), ezek nem ideálisak a hybridomák előállításához. Ezért ismételt oltással másodlagos immunválaszt indukáltunk az immunizált egereinkben, amely magas titerű, nagy aviditású ellenanyagok termelődését eredményezte. Az egereket a sejtfúziók

előtt "próbavéreztetettük", így egyrészt ellenőriztük az immunizálás hatékony voltát, másrészt a későbbi vizsgálatoknál nélkülözhetelen "pozitív kontroll" savókat is nyerhettünk.

A fúziók során 960 + 480 azaz összesen 1440 egyedi kultúrát vizsgáltunk meg a három, csirkesejtekkel immunizált egér lépsejt - SP2/0 fúzióját követően. Ebből 1259 esetben, az esetek 87%-ában figyeltünk meg hybridoma növekedést, ami igen magas szám és egyúttal azt jelenti, hogy a hybridizáció hatásfoka igen magas (>4.2x10-4) volt. Jelenti továbbá azt is, hogy egy-egy lyukban valószínűleg több hybridoma klón is fejlődött egyszerre.

Az egyedi kultúrákból 141 esetben (11%) sikerült csirke perifériás vér sejteivel reagáló ellenanyagot termelő hybridoma jelenlétét kimutatnunk. Ha a csirkesejtekkel szemben ellenanyagot termelő klónok ugyanolyan gyakorisággal fúzionáltak a myelomasejtekkel, mint az egyéb immunglobulint termelő sejtek, akkor az immunizálás során kialakult és a csirkesejtek antigénjeivel reagálni képes ellenanyagokat termelő sejtek is ehhez hasonló kiterjedtségű (11%-os) populációt alkotnak in vivo, az immunizált egérben, ami meglepően magas aránynak tűnik.

A fúziók során, függetlenül az immunizáláshoz használt sejtek típusától rendkívül sokféle hybridomát nyertünk, olyanokat amelyek nem, vagy nem csak a granulocytákkal, illetve a Fabricius-féle tömlő sejtekkel reagáló ellenanyagot termeltek. Ennek oka természetesen könnyen érthető, ha figyelembe veszünk két tényt: az egyik, hogy mely - csirke sejteken(ben) előforduló - molekuláris struktúrák idegenek, azaz antigének az egér számára, a másik pedig ezeknek az antigéneknek az eloszlása a csirkesejt populációk között. Ha az adott molekula például egy, a csirke MHC-hez tartozó "antigén", akkor minden egyes csirke-

sejten elő kell forduljon ugyanaz az epitóp, míg mások szövet, vagy csak egy adott sejtpopulációra nézve specifikusak. Mi a további vizsgálatokból kihagytuk (legfeljebb egy-egy kontroll-kísérletben használtuk fel) azokat a hybridomákat, amelyek ellenanyagai például "pánleukocyta", thrombocyta, vagy csirke-vörösvértest "specifikus" reagenseknek bizonyultak, bár tudjuk, hogy ezek az ellenanyagok számos további érdekes felhasználási lehetőséget kínálnak.

A kísérletekbe bevont csirkegranulocytákkal, illetve B sejtekkel reagáló ellenanyagok specificitását a következőekben felsorolt sejtekkel való reaktivitás (illetve a reaktivitás eloszlása alapján) határoztuk meg:

- csirke eredetű perifériás leukocyták
- csirke eredetű perifériás sejtekből szeparált plasztik adherens sejtek 1 és 3 napos adherencia után
- Fabricius-féle tömlő sejtek
- thymussejtek
- lépsejtek
- peritoneális exudátum sejtek
- szekunder embrionális fibroblastok
- LSCC-H32 transzformált fibroblast sejtek
- pulyka perifériás vér sejtek
- humán perifériás vér leukocták

E vizsgálatokról tudjuk, nem tekinthetők befejezettnek, hiszen egyenlőre még nem végeztük el a különböző csirkeszöveteken (például agyszövet, hereszövet, bél, stb) a próbákat. Azonban a perifériás vér, a lép, Fabricius-féle tömlő sejteken, fibroblastokon stb. megtörténtek ezek a specificitás vizsgálatok és ezt kísérleteink szempontjából egyenlőre elégségesnek ítéltük.

Ellenanyagaink sejtspecificitásának meghatározásában nagy segítséget jelentettek a Turkui Egyetem Mikrobiológiai Intézetében végzett cytofluorometriás vizsgálatok. Ezek a kísérletek bizonyították, hogy az 1C3 ellenanyag granulocyta specifikus és a granulocyták 95%-ával reagál, a 2C4 ellenanyag a granulocyták 93%-ával reagál, és emellett Fabricius-féle tömlő, illetve a perifériás vér B sejtjeihez kötődik, az 1C2 ellenanyag a granulocyták 51%-ával reagál, míg a 2C5 thrombocytaspecifikus (3.2.5 táblázat). Tehát egyik célunkat elértük, sikerült csirke granulocytákkal reagáló monoklonális ellenanyagokat előállítanunk.

Ellenanyagainkat complement-függő direkt, illetve indirekt cytotoxicitási tesztben is megvizsgáltuk. Kísérleteinkhez felhasznált ellenanyagaink egy része direkt módon is képes volt complementet kötni: 1C3, 2C4, 2C5, 2B1, 1C2, B2, B3, 1B3, 1D3, 2A1, 1/6, 1/24, 2/12. Más részüket azonban egy második ellenanyaggal (nyúl anti-egér immunglobulin) kellett kezelnünk, hogy megtörténhessen a complementkötés: 2C5, 1C1, 1B4, 1A6, 1C4, 1D5, 1/3, 1/9, 1/17, 1/22, 2/2, 2/13 (3.2.6. táblázat). A complementfüggő cytotoxicitási teszt eredményét néhány esetben az ellenanyagok immunglobulin szubtípusának meghatározásával is megerősítettük (3.2.7. táblázat). Ellenanyagaink közül a 2C5-re hívnám fel ebből a szempontból a figyelmet. Ez a thrombocytaspecifikus ellenanyag ugyanis az első vizsgálatok során complementkötőnek bizonyult. A hybridoma sorozatos klónozását követően azonban a szekretált immunglobulin elvesztette ezt a tulajdonságát. Feltételezzük, hogy a klónozások során egy olyan klónt szaporítottunk fel, amelyben nehézlánc immunglobulin gén átkapcsolódás történhetett. *Foon* és munkatársai (1983) figyeltek meg egy IgM típusú ellenanyagot szekretáló hybridoma esetében IgG1-re való "gén switching-et", azaz átkapcsolódást.

Ellenanyagainkat nem csak indirekt immunfluoreszcenciával, cytofluorométerrel, illetve complementfüggő cytotoxicitási tesztekben jellemeztük, hanem un. funkcionális vizsgálatokat is végeztünk velük.

4.3. Az ellenanyagok hatása a csirkeleukocyták spontán cytotoxicitására

Mint azt az előzőekben már leírtuk, a granulocyták a természetes cytotoxicitás (NK) kizárólagos (*Mándi* és mtsai., 1985), illetve az ADCC aktivitás (*Béládi*, 1984) egyik effektorsejtjei csirkékben. A granulocyták ellen kifejlesztett monoklonális ellenanyagainkkal mi is megerősítettük ezt a kísérleti eredményt. Granulocyta specifikus ellenanyaggal és complementtel kezelve a csirke perifériés vérből preparált leukocytákat elpusztítottuk az ellenanyagokkal reagáló sejteket, az NK reaktivitás erőteljes csökkenését tapasztaltuk (3.2.5 és 3.2.6. ábrák). A granulocyták ADCC reaktivitását tisztított granulocyta szuszpenziókkal vizsgáltuk, így a tesztrendszerben csökkent az ADCC reaktivitással ugyancsak rendelkező monocyták és LGL sejtek zavaró hatása. Ha a tisztított granulocyta szuszpenziót depletáltuk a granulocyta specifikus monoklonális ellenanyag és complementkezeléssel, az ADCC reaktivitás az eredeti érték 40 %-ára csökkent (3.2.8. ábra). Azt, hogy a granulocyta depléciókat követő reaktivitás csökkenés miért nem volt 100%-os, pontosan nem tudjuk, hiszen mind a 2C4, mind az 1C3 ellenanyag csaknem minden granulocytával reagál. Hasonló jellegű kísérletekben emlősök NK, illetve ADCC reaktivitásának vizsgálatakor sem lehetett teljes gátlást előidézni (*Nieminen* és

mtsai., 1982; *Rumpold* és mtsai., 1982; *Ohmann* és mtsai., 1985). Ennek esetleg metodikai okai is lehetnek. Egyrészt a granulocyta szuszpenzió tisztítása során, még ha viszonylag alacsony koncentrációban is, de maradhattak egyéb ADCC reaktivitású sejtek is a szuszpenzióban, másrészt az ellenanyaggal és complement kezeléssel történő sejtdepléció sem biztos, hogy 100%-os hatékonyságú: ha a targetsejtek felszínén az antigén denzitása alacsony, előfordulhatott, hogy ezek a sejtek "túlélték" a kezelést. További lehetőség az is, hogy az inkubáció során a rendszerben maradt, de már elpusztított effektorsejtekből felszabaduló toxikus faktorok lizálják a targetsejtek egy részét.

Számunkra legérdekesebb az a megfigyelésünk volt, hogy az egyik - az 1C3 - ellenanyagunk önmagában, complement hozzáadása nélkül képes volt gátolni mind az NK, mind az ADCC reakciót (*Mándi* és mtsai., 1987a). Ilyen hatást a többi granulocyta ellenes ellenanyagok (2C4, 1C2, B2, B3) esetében nem tapasztaltunk (3.2.7., 3.2.9. ábrák). Azt, hogy hogyan fejti ki ez az ellenanyagunk a gátló hatását, egyenlőre csak találgathatjuk. Az 1C3 gátolja az EA rozetták képződését (3.2.8. táblázat). Az ADCC reakcióban a granulocyták targetsejthez kötődése, hasonlóan az EA rozetta képződéshez Fc receptor által mediált folyamat (*Perussia* és mtsai., 1983a és b.). Ez pedig arra utalhat, hogy az 1C3 ellenanyag az ADCC reakciót az effektor-target kapcsolódásának szintjén befolyásolhatja, azaz a granulocyták Fc receptorához, vagy esetleg egy ahhoz szorosan kapcsolódó struktúrához kötődik (3.2.5. fejezet). Ez azonban az ellenanynagnak az NK reakcióra gyakorolt hatását nem magyarázza, mivel ahogy azt *Mándi* és mtsai. (1985) kimutatták a csirkék NK reakciójában a granulocyta Fc receptor nem játszik szerepet. A granulocyták tripszin kezelésével az NK receptorok a sejtek felszínéről el-

távolíthatók, még ugyanez a tripszinkezelés nem befolyásolja a granulocyták ADCC reaktivitását, mivel az Fc receptorok tripszinrezisztensek. Kísérleteinkben megvizsgáltuk az 1C3 ellenanyaggal reagáló struktúrák tripszinnel való emészthetőségét is: ezek tripszinszenzitívnek bizonyultak (3.2.5. fejezet). Ez az antigén nem lehet a granulocyták Fc receptora, estleg - mint azt az előzőekben leírtam - valamilyen, az Fc receptorral szoros kapcsolatban levő struktúra. Megvizsgáltuk az 1C3 ellenanyag hatását az effektor-target sejtek kapcsolódására az NK reakcióban: ezt a folyamatot az ellenanyag nem gátolta (3.2.5. fejezet). Azt is kimutattuk, hogy az 1C3 ellenanyag monocytákhoz nem képes kapcsolódni (3.2.10. ábra), bár mint tudjuk ezeken a sejteken is vannak Fc receptorok. Ennek egyik magyarázata lehet az Fc receptorok sejttípusonkénti polimorfizmusa, amint azt *Perussia* és mtsai. (1984) kimutatták. Összehasonlítottak 5, human NK sejt és granulocytaspecifikus ellenanyagot. Megállapították, hogy mindegyik gátolja az IgG kötő Fc receptor funkciókat a velük kapcsolódó sejteken, így gátolják ezeknek a sejteknek az ADCC aktivitását is. Az ellenanyagokkal reagáló sejteken hiányzik a legtöbb T-, illetve B sejt marker. Ezek a sejtek LGL morfológiájúak. Mint megállapították, az öt ellenanyag legalább 2 különböző epitópot ismer fel az Fc receptor molekulán. Ezek az ellenanyagok sem B sejtekkel, sem pedig monocytákkal nem reagálnak, ami az ő esetükben is azt mutatta, hogy ezeknek a sejteknek az Fc receptora antigenitásában különbözik az NK sejteken, illetve a granulocytákon megtalálható Fc receptoroktól.

Bár az NK és az ADCC reakciókban szerepet játszó receptor struktúrák különbözőek, azonban ahogy azt *Burns* és mtsai. (1983) kimutatták, a következő, a cytotoxicitást eredményező

lépés mechanizmusa azonos, vagy legalábbis nagyon hasonló. Igy lehetséges, hogy az ellenanyagunk egy, ebben a második lépésben szerepet játszó molekulához kötődik és ez egy olyan kopmlex, amely szoros kölcsönhatásban van a sejtek Fc receptorával. Ebben az esetben is két lehetőség merül fel: vagy közvetlen sztérikus gátlás léphet fel, vagy pedig co-capping játszódhat le (*Melnick* és mtsai., 1985).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az 1C3 ellenanyag az ADCC reakciót az effektor - target sejtek kapcsolódásának szintjén gátolja. Ilyen típusú gátlást az NK reaktivitásban nem tudtunk kimutatni. Az 1C3 ellenanyag által felismert molekula valószínűleg fehérjetermészetű, mivel tripszines emésztéssel eltávolítható a sejtek felszínéről. Az antigén tripszinszenzitivitása azt is bizonyítja, hogy nem lehet a granulocyták Fc receptorával azonos, mivel az egy tripszinrezisztens struktúra.

4.4. Monoklonális ellenanyagaink hatása a csirke leukocyták vírusindukálta interferontermelésére

A 3.2.6 fejezetben ismertettük, hogy találtunk egy olyan monoklonális ellenanyagot, amely complement jelenlétében képes elpusztítani a vírusindukálta interferont termelő sejteket. Ez az ellenanyag a 2B1, amely a Fabricius-féle tömlő sejtjeinek 100%-ával, a perifériás B sejtekkel, illetve monocytákkal is reagál. Korábbi, Fabricius-féle tömlő sejtjei ellen termelt poliklonális savóval végzett vizsgálatok utaltak arra, hogy a vírusindukálta interferontermelésben a B lymphocytáknak fontos szerepük lehet (*Pusztai* R., személyes közlés). De mint az később kiderült, ez a poliklonális savó nemcsak a B sejtekkel,

hanem a csirke perifériás vér monocytáival is reagál (3.2.12. táblázat). A granulocyta specifikus 1C3, valamint a thrombocytákkal reagáló 2C5 ellenanyagok segítségével tisztáztuk, hogy ezek a sejtek nem játszanak közvetlen szerepet az adenovírus indukálta interferontermelésben (3.2.10. táblázat). Négy másik, Fabricius-féle tömlő sejtekkel reagáló ellenanyaggal, a, 1/6-al (9%), 1/9-el (25%) 2C4-el (30%) és 2A/12-vel (50%) végzett vizsgálatok azt támasztották alá, hogy nem minden B sejt képes a vírusindukálta interferontermelésre. Ha ezekkel az ellenanyaggokkal és complementtel kezeltük a csirke perifériás vér sejtjeit, az interferontermelődés nem csökkent (3.2.10. táblázat). Viszont a későbbiekben kiderült, hogy a 2B1 ellenanyag az egyedüli, amely a plasmasejtekkel is reagál, ugyanis csak ezzel az ellenanyaggal és complementkezeléssel lehetett gátolni a Jerne-féle haemolitikus plakkok képződését (3.2.11. táblázat), így a B sejtek közül a plasmasejtek azok, amelyek biztosan nem zárhatók ki a vírusindukálta interferontermelő sejtek közül. A monocyták szerepét is megkíséreltük tisztázni. Mivel a 2B1 + complementkezelés drasztikusan csökkentette az üvegadherens, ADCC reakcióban aktív (3.2.10. ábra), nemspecifikus észteráz pozitív sejtek (3.2.12. táblázat), azaz a monocyták számát is, így a monocyták szerepét sem zárhattuk ki, annál is inkább, mivel a többi, B sejtekkel is reagáló ellenanyagnak, amelyek nem befolyásolták a vírusindukálta interferontermelődést, ilyen monocyta ellenes hatása nem volt. Továbbra sem tudtuk tehát eldönteni, hogy a monocyták, a B sejtek, vagy mindkét sejttípus a fő komponens a vírusindukálta interferontermelődésben. Irodalmi adatokból tudjuk, hogy a vírusindukálta interferontermelődés a kísérleti körülményektől füg-

gően emlősökben is többféle sejtpopulációhoz kötődik (*Vilcek* és *De Maeyer*, 1984).

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerző ezúton mond köszönetet Andó Istvánnak, aki a "mély vízbe dobással" elősegítette az önálló immunológus-gondolkodás képességének megszerzését. Köszöni Béládi Ilona professzorasszonynak, hogy lehetőséget adott és biztatott e munka elvégzésére a Mikrobiológiai Intézetben. Külön köszönet illeti Pusztai Rózsát és Mándi Yvette-t azért a sok emberi és szakmai segítségért, ami nélkül ez a dolgozat talán meg sem születhetett volna. A kísérletek gyakorlati kivitelezésében pedig Seprényi Györgynek, Berencsi Klárának, Bakai Mártának és Endrész Valériának jár köszönet. Végül, de természetesen nem utolsó sorban áldozatos és megbízható asszisztensi munkájukért köszönet illeti Hegedűs Katalint és Horváth Katalint.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Aitken I.D., 1975:
A madár immunbiológiai kutatások időszerű kérdései és újabb eredményei.
A Magyar Immunológia Társaság és a MAE Állatorvosok Társasága Baromfiegészségügyi Szakosztálya 1975 árpilisi ülésén elhangzott előadásának magyar nyelvű fordítása.

2. Albini B., Wick G., 1974:
Delineation of B and T lymphoid cells in the chicken
J. Immunol. 112/2, 444.

3. Baumal R., Bloom B., Scharff M.D., 1971:
Induction of long term lymphocyte lines from delayed hypersensitive human donors using specific antigen plus Epstein-Barr virus.
Nature 230, 20.

4. Béládi I., Bakay M., Pusztai R., Hidasi G., 1970:
Induction of interferon in chick cells by adenovirus of different origin.
J. Gen. Virol. 8, 143.

5. Béládi I., Pusztai R., 1967:
Interferon like substance produced in chick fibroblast cells inoculated with human adenovirus.
Zeitschr. Naturforsch. 22, 165.

6. Béládi I., Mándi Y., Bakay M., 1984:
Role of the interferon in the activation of NK and K cells during viral infection.
Tissue Cult. Res. 23,138.

7. Béládi I., Pusztai R., Bakay M., Mucsi I., Taródi B., 1979.:
Interferon induction by adenoviruses.
Postgrad. Med. J. 55, 128.

8. Berg K., 1984:
Identification, production and characterisation of murine monoclonal antibody (LO-22) recognizing 12 native species of human alpha interferon.
J. Interferon Res. 4, 481.

9. Bhogal B.S., Tee H.Y., Jacobson E.B., Schmalz D.M., 1986:
Chicken T lymphocyte clones with specificity for Eimeria tenella. I. Generation and functional characterisation.
J. Immunol. 137, 3318.

10. Bosveld I.J., Vonk W.P., Hekman R.A.C.P., van Vliet P.W., de Jonge P., van Ewijk W., Trappman J., 1982:
Prepatration and properties of monoclonal antibodies against murine interferon ß.
Virology 120, 235.

11. Burns G.T., Triglia T., Bartlett P.F., Machay I.R., 1983:
Human natural killer cells, activated lymphocyte killer cells and monocytes posess similar cytotoxic mechanisms.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7606.

12. Cooper M.D., CAin W.A., van Alten P.J., Good R.A., 1969:
Developement and function of immuneglobulin producing system. I. Effect of Bursectomy at different stages of development on germinal centers plasma cells, immunglobulins and antibody production.
Int. Arch. Allergy 35, 242.

13. Edelman A.S., Bhogal B.S., Bell M.K., Thorbecke G.J., 1985:
Ability of chicken B cells from different compartments to respond to TNP-Ficoll.
J. Immunol. 134/5, 2879.

14. Eerola E., 1983:
Function of bursa Fabritius. The effect of bursal epithelium on the early B cell differentiation in the chicken.
Academic dissertation, Medical Faculty of the University of Turku, pp. 16, 1983.

15. Fitzsimmons R.C., Garrod E.M.F., Garnett I., 1973:
Immunological responses following early embryonic surgical busrsectomy.
Cell. Immunol. 9, 377.

16. Foon K.A., Buescher S., Kimball E.S., Huang L.C., Stevenson H.C., Clark G., Gregorio T., Harley J.B., 1983:
Monoclonal antibody to human eosinophils recognizing 95kd surface membrane antigen.
Hybridoma 2/4, 393.

17. Friedmann R.M., Vogel S.N., 1983:
Interferon with special emphasis on the immune system
Adv. Immunol. 34, 97.

18. Grebenau M.D., Chi D.S., Thorbecke G.J., 1979):
T cell tolerance in the chicken. II. Lack of evidence for suppressor cells in toleran aggammaglobulinemic and normal chickens.
Eur. J. Immuol. 9, 447.

19. Grecchi R., Saliba A.M., Mariano M., 1980:
Morphological changes, surface receptors and fagocytic potential of fowl mono-nuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro.
J. Path. 130, 23.

20. Gribaudo G., Cofano F., Prat M., Landolfo S., 1985:
Monoclonal antibodies to murine interferon-τ.
J. Interferon Res. 5/1, 199.

21. Hadas E., Theiler G., 1987:
Production of monoclonal antibodies. The effect of hybridoma concentration on yield of antibody-producing clones.
J. Immunol. Meth. 96, 3.

22. Hardy R.R., Hyakawa K., 1986:
Developement and physiology of LY 1 B and its human analog.
Immunol. Rew. 93, 53.

23. Hjorth R., Johnsson A., Vrethlad P., 1981:
A rapid method for purification of human granulocytes using Percoll. A comparison with dextran sedimentation.
J. Immunol. Meth. 43, 95.

24. Hochkeppel H.K., Menge U., Collins J., 1981a:
Monoclonal antibodies against human fibroblast interferon.
Eur. J. Biochem. 118, 437.

25. Hochkeppel H.K., Menge U., Collins J., 1981b:
Monoclonal antibodies against human fibroblast interferon.
Nature 291, 500.

26. Houssaint E., Tobin S., Cihak J., Lösch U., 1987:
A chicken leukocyte common antigen:

biochemicalcharacterization and onotegenetic study.
Eur. J. Immunol. 17, 287.

27. Hudson L., Hay F.C., 1980:
IN: Practical Immunology (second edition), Blackwell Scientific Publication, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne. pp.237.

28. Jalhanen S., Granfors K., Jalhanen M., Toivanenn P., 1983:
Immune capacity of the chicken bursectomized at 60 hours of incubation: Failure to produce immune, natural and autoantibodies in spite of immunglobulin production.
Cell. Immunol. 80, 363.

29. Kendal M.D., 1980
Avian thymus glands: A rewiev.
Devlop. Compar. Immunol. 4, 191.

30. Kermani-Arab V., Leslie G.A., 1977:
Suppression of immunglobulin synthesis by transplantation of T cells from anti-μ bursectomized chickens into normal recipients.
J. Immunol. 119, 530.

31. Klein J.,1986:
Natural history of the major histocompatibility complex. Willey Interscience, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1986, pp. 82.

32. Kohase M., Moriya H., Sato T.A., Kohno S., Yamazaki S., 1986:
Purification and characterization of chick interferon induced by virus.
J. Gen. Virol. 67, 215.

33. Köhler G., Milstein C., 1975:
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature 256, 495.

34. Lamont S.J., van Alten P.J., 1981:
Characteristics of nylon fiber adherence-separated chicken splenocytes.
J. Immunol. Meth. 40, 181.

35. Le J., Barrowclough S., Vilcek J., 1984:
Monoclonal antibodies to human immune interferon and their application for affinity chromatography.
J. Immunol. Meth. 69, 61.

36. Le J., Rubin B.Y., Kelher H.C., 1984a:
Natural and recombinant Escherichia coli-derived interferon-gamma differ in their reactivity with monoclonal antibody.
J. Immunol. 132/3, 1300.

37. Lemez L., 1979:
Qualitative data on haemocytoblasts, granulocytes, lymphocytes and monocites in circulating blood of chick embrios.
Folia Biol. 25, 319.

38. Lerner K.G., Glick B., McDuffie F.C., 1971:
Role of the bursa of Fabricius in IgG and IgM production in the chicken: Evidence for the role of a non-bursal site in the devlopement of humoral immunity.
J. Immunol. 107, 493.

39. Littlefield J.W., 1964:
Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants.
Science 145, 709

40. Mándi Y., Bakay M., Béládi I., 1984:
Effect of interferon on antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in chickens.
Acta Micrbiol. hun. 31/2, 127.

41. Mándi Y., Pusztai R., Baranyi K., Seprényi G., Taródi B., Bakay M., Béládi I., 1987b:
The role of interferon in the adenovirus-induced augmentation of granulocyte-mediated cytotoxicity in chicken.
Immunbiol. 174, 210.

42. Mándi Y., Seprényi G., Pusztai R., Béládi I., 1985:
Are granulocytes the main effector cells of natural cytotoxicity in chickens?
Immunobiol. 170, 284.

43. Mándi Y., Veroma T., Baranji K., Miczák A., Béládi I., 1987a:
Granulocyte specific monoclonal antibody inhibiting cytotoxicity reactions in the chicken.
Immunbiol. 174,

44. Margulies D.H., Kuehl W.M., Scharff M.D., 1976:
Somatic cell hybridisation of mouse myeloma cells.
Cell 8, 405.

45. Meager A., Berg K., 1986:
Epitope localisation of monoclonal antibody, LO-22 with broad specificity for interferon-α subtypes.
J. Interferon Res. 6, 729.

46. Meager A., Panti S., Barwick J., Spragg K., O'Hagan J., 1984:
Detection of hybridomas secreting monoclonal antibodies to human gamma interferon using a rapid screening technique and specificity of certain monoclonal antibodies to gamma interferon.
J. Interferon Res. 4, 619.

47. Melnieck D.A., Nauseef W.M., Markowitz S.D., Gardner J.P., Malech H.L., 1985:
Bichemical analysis and subcellular localisation of a neutrophil specific antigen, PMN-7, involved in the respiratory burst.
J. Immunol. 134/5, 3346.

48. Mucsi I., Pusztai R., Béládi I., Bakay M., 1970:
Production of high titres of interferon on chicken leucocyte cultures inoculated with human adenovirus type 12.
Acta Virol. 14, 453.

49. Mueller és mtsai., 1971. IN: Aitken I.D., 1975: A madár immunbiológiai kutatások idôszerû kérdései és újabb eredményei.
A Magyar Immunológia Társaság és a MAE Állatorvosok Társasága Baromfiegészségügyi Szakosztálya 1975 árpilisi ülésén elhangzott elôadásának magyar nyelvû fordítása.

50. Murphy J.B., 1916:
The effect of adult chicken organ graft on the chick embryo.
J. Exp. Med. 24, 1.

51. Nieminen P., Paasivuo R., Saksela E., 1982:
Effect of monoclonal anti-large granular lymphocyte antibody on the human NK activity.
J. Immunol. 128, 1097.

52. Nisbet N.W., Simmonsen M., Zaleski M., 1969
The frequency of antibody sensitive cells in tissue transplantation: A commentary of clonal selection.
J. Exp. Med. 129, 459.

53. Novick D., Eshhar Z., Rubinstein M., 1982:
Monoclonal antibodies to human α-interfeon and their use for affinity chromatography.
J. Immunol. 129/5, 2244.

54. Ohmann H., Davis W., Babink L., 1985:
Functional and phenotypic characterisation of bovine natural cytotoxic cells.
Immunbiol. 169, 503.

55. Oláh I., Glick B., Taylor R.L., 1984:
Effect of soluble antigen on the ellipsoid associated cells of the chicken's spleen.
J. Leukocyte Biol. 35. 501.

56. Osheroff P.L., Takara S.M., Chiang. T.R., 1984:
Monoclonal antibodies to a recombinant human leucocyte interferon (r IFN-αB).
Clin. Immunol. Immunpathol. 30/2, 188.

57. Pace J.L., Barger B.O., Dawe D.L., Ragland W.L., 1978:
Specific antigens of chicken thymus.
Eur. J. Immunol. 8/9, 671.

58. Palladino M.A., Thorbecke G.J., 1978a
Immunity to transplantable, carcinogen-induced fibrosarcomas in B2/B2 chickens. I. Use of bacterial adjuvans in induction of immunity demonstrable in Winn tests.
Cell Immunol. 38, 336.

59. Palladino M.A., Thorbecke G.J., 1978b
Immunity to transplantable, carcinogen-induced fibrosarcomas in B2/B2 chickens. II. Macrophage dependency of adoptive T cell mediated tumor immunity.
Cell Immunol. 38, 350.

60. Perussia B., Acuto O., Terhorst C., Faust J., Lazarus R., Fanning V., Trinchieri G., 1983a:
Human natural killer cells analysed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody - antigen interaction on the lymphocyte membrane.
J. Immunol. 130/5, 2142.

61. Perussia B., Starr S., Abraham S., Fanning V., Trinchieri G., 1983b:
Human natural killer cells analyzed by B73.1., a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1.
J. Immunol. 130/5, 2133.

62. Perussia B., Trinchieri G., Jackson A., Warner N.L., Faust J., Rumpold H., Kraft D., Lanier L.L., 1984:
The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies.
J. Immunol. 133/1, 180.

63. Petrányi Gy., Benczúr M., Falus A., 1988, szerkesztésében:
Klinikai immunológia I. pp. 161.
OHVI Füzetek 14.
Medicina, Budapest 1988.

64. Pink J. R., Rijnbeck A., 1983:
Monoclonal antibodies against chicken lymphocyte surface antigens.
Hybridoma 2/3, 287.

65. Prat M., Gribaudo G., Comoglio M., Cavallo G., Landolfo S., 1984:
Monoclonal antibodies against murine γ-interferon.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 81, 4515

66. Pusztai R., Bakay M., Mucsi I., Béládi I., 1969:
Interferon induction by human adenovirus in vivo.
Acta Virol. 13, 71.

67. Pusztai R., Taródi B., Béládi I., 1986:
Production and characterisation of interferon induced in chicken leucocytes by concanavalin A.
Acta virol. 30, 131.

68. Roit I.M., 1988:
Essential immunology
Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melburne, 6th Edition

69. Rumpold H., Kraft D., Obexer G., Böck G., Gebhart W., 1982:
A monoclonal antibody against large granular lymphocytes and granulocytes.
J. Immunol. 129, 1458.

70. Sabet T., Hsia W.C., Staniszés M., Domeini A., van Alten P., 1977:
A simple method for obtaining peritoneal macrophages from chickens.
J. Immunol. Meth. 14, 103.

71. Sano T., Yanase Y., Tanaka E., Usuda S., Tachibana K., Imai M., Nakamura T., Miyakawa Y., Mayumi M., 1983:
A two-site sandwich radioimmunoassay of human fibroblast (beta-) interferon with monoclonal antibodies.
J.Immunol. Meth. 64, 31.

72. Schaefer A.E., Scafuri A.R., Fredericcksen L., Gilmour D.G., 1985:
Strong suppression by monocytes of T cell mitogenesis in chicken periferial blood leucocytes.
J. Immunol. 135/3, 1652.

73. Schauenstein K., 1979:
Surface characteristics of chicken periferal B and T lymphocytes by specific heteroantisra.
Devel. Compar. Immunol. 3, 321.

74. Schauenstein K., Globerson A., Wick G., 1982:
Avian lymphokins: I. Thymic cell growth factor in supernatants of mitogen stimulated chicken spleen cells.
Develop. Compar. Immunol. 6, 533.

75. Seto F., 1981:
Early development of the avian immune system.
Poultry Science 60, 1981.

76. Sharma J.M., Okazaki W., 1981:
Natural killer cell activity in chickens: target cell analysis and effect of antithymocyte serum on effector cells.
Infec. Immun. 31, 1078.

77. Sorvari T., Sorvari R., Routsalainen P., Toivanenn A., Toivanenn P., 1975:
Uptake of enviromental antigens by the bursa of Fabricius.
Nature 253, 217.

78. Stinson R.S., Mashaly M.M., Glick B., 1979:
Thrombocyte migration and the release of thrombocytes inhibitory factor (ThrIF) by T and B cells in the chicken.
Immunology 36, 769.

79. Sutton J.S., Weiss L., 1966
Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epitheloid cells and multinucleated giant cells.
J. Cell. Biol. 28, 303.

80. Taródi B., Pusztai R., Berencsi K., 1975:
Physicochemical characteristics of interferons induced by human adenovirus in chick fibroblasts and leucocytes.
Acta Virol. 19, 393.

81. Thacore H.R., Kibler P.K., Gregorio C.C., Pollina C.M., Hudecki M.S., 1985:
Characterisation of lymphocyte interferons with different species specificities from normal and genetically dystrophic chickens.
J. Int. Res. 5, 279.

82. **Todd P.E.E., East I.J., Leach S.J., 1982:**
The immunogenecity and antigenecity of proteins.
TIBS, June, 212.

83. **Toivanen P., Toivanen A., 1983):**
Avian major histocompatibility complex.
Disease prevention and control in poultry production. Proc. of Australian Veterinary Poultry Association 66, 107.

84. **Traill K.N., Böck G., Boyd R., Wick G., 1983:**
Chicken thrombocytes. Isolation, serological and functional characterisation using the flourescense activated cell sorter.
Develop. Comp. Immunol. 7, 111.

85. **Trembicki K.A., Quereshi M.A., Dietert R.R., 1984:**
Avian peritoneal exudate cells: Comparison of stimulation protocolls.
Develop. Compar. Immunol. 8, 395.

86. **Trembicki K.A., Quereshi M.A., Dietert R.R., 1986:**
Monoclonal antibodies reactive with chicken peritoneal macrophages: identification of macrophage heterogeneity.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 183, 28.

87. **Vanio O., Ratcliffe M.J.H., 1984:**
Proliferation of chicken periferal blood leukocytes in response to pokeweed mitogen is macrophage dependent.
Cell. Immunol. 85, 235.

88. **Veromaa T., Jalhannen S., Granfors K., Toivanenn P., 1986:**
Inability to transfer immune unresponsiveness of chickens bursectomized at 60 hours of incubation.
Transplantation 42/2, 197.

89. **Vilcek J., De Maeyer E., 1984:**
Interferons and the immune system.
Interferon 2, 6.

90. Whittall T.D., King R.M., Burke D.C., 1984:
The reaction of the anti-interferon-α monoclonal antibody, NK2, with different interferons.
J. Gen. Virol 65, 629.

91. Wick G., Schauensten K., Thunold S., Boyd R.L., 1982:
IgG-Fc and C3 receptors in the chicken: distribution tissue localization and functional significance.
Mol. Immunol. 19/10, 1267.

92. Wysocky L.J., Sato V.L., 1978:
"Panning" for lymphocytes: A method for cell selection.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75/6, 2844.

2355
1990