

Svoluji k zapůjčení své disertační práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně odcitovat.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na vzniku této práce.

Především děkuji týmu školitelů, Mgr. Janu Čerému, PhD, RNDr. Jiřímu Šinkorovi, CSc. a MVDr. Zuzaně Řehákové, CSc za rady a pomoc v průběhu práce.

Zvláštní poděkování patří také profesoru J.E. Butlerovi a jeho týmu na University of Iowa za vlídné přijetí a vytvoření skvělých pracovních podmínek.

Díky patří rovněž mým kolegům z ÚŽFG AV ČR za trpělivost a podporu, kterou mi poskytovali během sepisování této práce.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

**ONTOGENEZE B LYMFOCYTŮ U VYBRANÝCH
VETERINÁRNÍCH DRUHŮ SAVCŮ.**

Disertační práce

Mgr. Alena Morávková

Praha 2005

Školitel: Mgr. Jan Černý, PhD
Školitel specialista: RNDr. Jiří Šinkora, CSc.
MVDr. Zuzana Řeháková, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury a pod vedením výše uvedených vedoucích práce.

OBSAH

Seznam zkratk.....	6
1. Úvod.....	8
2. Cíle práce.....	10
3. Literární přehled.....	11
3.1. Primární centra krvetvorby.....	11
3.2. Hematopoetické kmenové buňky.....	12
3.3. Linie krvetvorby.....	13
3.3.1. Myeloidní linie.....	13
3.3.1.1. Dendritické buňky.....	15
3.3.2. Lymfoidní linie.....	16
3.3.2.1. NK buňky.....	16
3.3.2.2. Vývoj T buněčné linie.....	16
3.3.2.3. NK-T lymfocyty.....	18
3.3.2.4. Vývoj B buněčné linie.....	18
3.3.2.4.1. Molekula CD2.....	20
3.3.2.4.2. Molekula CD19.....	21
3.3.2.4.3. Molekula CD79.....	21
3.3.2.4.4. Ontogeneze diverzity repertoáru B buněk.....	22
3.3.2.4.5. Model PR.....	23
3.3.2.4.6. Model GALT.....	23
3.4. Gnotobiologie.....	25
3.5. Prase jako imunologický model.....	26
3.5.1. Monoklonální protilátky proti povrchovým molekulám prasečích lymfocytů.....	26
3.5.2. Myelomonocytární linie.....	27
3.5.3. T lymfocyty.....	28
3.5.3.1. Unikátní typy T lymfocytů v periferní krvi prasat.....	28
3.5.4. B lymfocyty.....	29
3.5.4.1. Vývoj repertoáru prasečích B buněk.....	31
3.6. Pes jako imunologický model.....	32
4. Materiál a metody.....	33
4.1. Experimentální zvířata.....	33
4.2. Příprava buněčných suspenzí.....	34
4.3. Značení buněk pro průtokovou cytometrii.....	35
4.3.1. Použité protilátky.....	35
4.3.2. Povrchové značení buněk pro průtokovou cytometrii.....	36
4.3.2.1. Přímé značení.....	36
4.3.2.2. Dvojitě nepřímé značení.....	36
4.3.3. Intracelulární značení.....	37
4.3.4. Měření na průtokovém cytometru.....	37
4.4. Třídění buněk.....	38
4.4.1. Třídění buněk pomocí magnetu (magnetický sorting).....	38
4.4.2. Třídění buněk na přístroji FACS Ventage.....	39
4.5. Příprava podpurných buněk thymového stromatu.....	39

4.6.	Kultivace buněk.....	40
4.7.	Příprava a testování hybridomů.....	40
4.8.	Polymerázová řetězová reakce.....	41
5.	Výsledky	42
5.1.	Prasečí model.....	42
5.1.2.	Molekula CD19.....	42
5.1.2.1.	Sekvenování CD19 a určení mezidruhové homologie.....	42
5.1.2.2.	Příprava monoklonálních protilátek proti CD19.....	43
5.1.2.3.	Expresce prasečího CD19 v bakteriích.....	43
5.1.2.4.	Příprava a analýza hybridomů.....	43
5.1.3.	Příprava monoklonálních protilátek proti dalším povrchovým proteinům buněk B lymfocytární řady.....	44
5.1.4.	Identifikace buněk B linie ve fetální kostní dřeni pomocí monoklonální protilátky proti CD79 α	45
5.1.5.	Distribuce B lymfoidních buněk ve fetální kostní dřeni.....	46
5.1.6.	Charakterizace prekurzorů B buněk v mononukleární frakci leukocytů prasečí fetální kostní dřeni pomocí povrchové exprese imunoglobulinů	50
5.1.7.	Další fenotypizace CD79 α ⁺ mononukleárních buněk fetální prasečí kostní dřeni.....	53
5.1.8.	Kultivace.....	55
5.1.9.	Detekce buněk B lymfoidní linie ve fetálních orgánech prasat.....	57
5.2.	Psí model.....	59
5.2.1.	Analýza CD34 pozitivních buněk kostní dřeni psů.....	59
5.2.2.	Prekurzory B buněčné linie v kostní dřeni psů.....	61
6.	Diskuse	64
6.1.	Příprava specifických monoklonálních protilátek proti povrchovým molekulám prasečích lymfocytů.....	64
6.2.	B lymfopoeza prasat.....	66
6.3.	B lymfopoeza psů.....	70
7.	Závěr	72
8.	Přehled citované literatury	73
Přílohy – Faldyna M., Sinkora J., Knotigova P., Rehakova Z., Moravkova A., Toman M.: Flow cytometric analysis of bone marrow leucocytes in neonatal dogs.		
Sun J., Sinkora J., Wertz N., Moravkova A., Butler J.E.: Characterization of porcine CD19 and anti-CD19 monoclonal antibodies.		
Moravkova A., Malek O., Pokorna E., Strnadel J., Hradecky J., Horak V. Immune characterization of the Lewis rats inoculated with K2 sarcoma cell line and newly derived R5-28 malignant cells.		

SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Plné znění česky	Plné znění anglicky
κ	Kappa lehký řetězec imunoglobulinu	Kappa Immunoglobuline Light Chain
λ	Lambda lehký řetězec imunoglobulinu	Lambda Immunoglobuline Ligh Chain
AGM	Oblast aorty, gonád a mezonefru	Aorta-gonado-mesonefros area
APC	Allofykocyanin	Allophycocyanine
BCR	Antigenní receptor B buněk	B Cell Receptor
BM	Kostní dřeň	Bone Marrow
CD	Skupina diferenciačních znaků	Cluster of diferentiation
CFU	Elementy tvořící kolonie	Colony Forming Units
CFU-E	Elementy tvořící kolonie erytrocytů	Erythrocyte Colony Forming Units
CFU-Eos	Elementy tvořící kolonie eosinofilů	Eosinophile Colony Forming Units
CFU-G	Elementy tvořící kolonie granulocytů	Granulocyte Colony Forming Units
CFU-GM	Elementy tvořící kolonie granulocytů a makrofágů	Granulocyte/Macrophage Colony Forming Units
CFU-M	Elementy tvořící kolonie makrofágů	Macrophage Colony Forming Units
CFU-Mast	Elementy tvořící kolonie mastocytů	Mastocyte Colony Forming Units
CFU-Mk	Elementy tvořící kolonie megakaryocytů	Megacaryocyte Colony Forming Units
CTL	Cytotoxický T lymfocyt	Cytotoxic T lymphocyte
DC	Dendritická buňka	Dendritic Cell
DG	Den gestace	Day of Gestation
DP	Dvojitě pozitivní	Double positive
ELISA	Enzymový imunologický test	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
FACS	Fluorescenční aktivovaný tříděč buněk (proudový cytometr)	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCM	Fluorescenční cytometrie	Flow Cytometry
FCS	Fetální telecí sérum	Fetal Calf Sera
FITC	Fluorescein izothiocyanát	Fluorescein izothiocynate
FL	Fetální játra	Fetal Liver
FSC	Rozptyl světla měřený v přímém směru	Forward Scatter
GALT	Lymfoidní tkáň asociované se střevem	Gut Associated Lymphoid Tissue
GF	Bezmikrobní	Germ Free
HLA	Lidské leukocytární antigeny	Human Leucocyte Antigen
HSC	Hematopoetické kmenové buňky	Hematopoietic Stem Cells
HS-RC	Buňky resistantní k hypotonickému šoku	Hypotonic Shock Resistent Cells
HRP	Křenová peroxidáza	Horse Radish Peroxidase
Ig	Imunoglobulin	Immunoglobuline
IgA	Podtyp imunoglobulinu	Immunoglobuline subtype
IgM	Podtyp imunoglobulinu	Immunoglobuline subtype
IgD	Podtyp imunoglobulinu	Immunoglobuline subtype
IgE	Podtyp imunoglobulinu	Immunoglobuline subtype
IgG	Podtyp imunoglobulinu	Immunoglobuline subtype
IL-2	Interleukin 2	Interleukine 2
IL-7	Interleukin 7	Interleukine 7

ITAM	Imunoreceptorový tyrosinový aktivační motiv	Immunoreceptor Tyrosine Activatory Motif
ITIM	Imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv	Immunoreceptor Tyrosine Inhibitory Motif
kDa	Tisíc daltonů	kiloDaltons
LDC	Lymfoidní dendritická buňka	Lymphoid Dendritic Cell
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex	Major Histocompatibility Complex
MoAb	Monoklonální protilátka	Monoclonal Antibody
M.W.	Molekulová hmotnost	Molecular Weight
NPS	Normální prasečí sérum	Normal Pig Sera
PAS	Paraaortální splachnopleura	Paraaortic Splanchnopleura
PBS	Fosfátový pufr	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerázová řetězová reakce	Polymerase chain reaction
PE	Fykoerytrin	Phycoerytrine
PR	Primáti a hlodavci	Primates and Rodents
PreBCR	Vývojová forma antigenního receptoru B buněk	Pre-B cell receptor
PreTCR	Vývojová forma antigenního receptoru T buněk	Pre-T cell receptor
RPE	R-fykoerytrin	R-phycoerytrine
SLA	Prasečí leukocytární antigeny	Swine Leucocyte antigen
SCF	Růstový faktor kmenových buněk	Stem Cell Factor
SIRP	Signalizaci regulující fosfatáza	Signal Regulatory Phosphatase
s μ	Povrchový imunoglobulinový řetězec μ	Surface μ heavy immunoglobuline chain
SSC	Rozptyl světla měřený pod pravým úhlem	Side Scatter
SwAM	Prasečí protilátka proti myším imunoglobulinům	Swine Immunoglobulines anti Mouse Immunoglobulines
SWC		Swine Workshop Cluster
TCR	Antigenní receptor T buněk	T Cell Receptor
TdT	Terminální deoxynukleotid transferáza	Terminal Deoxynucleotide Transferase
T _H	Pomocný T lymfocyt	Helper T lymphocyte
WSB	Promývací pufr	Wahing and Staining Buffer
YS	Žloutkový vak	Yolk Sac

..

1. ÚVOD

Prase domácí je jedním z nejdůležitějších hospodářských zvířat. V České republice je chováno kolem 3.5 mil. prasat a každoroční spotřeba vepřového masa činí 40.9 kg na rok a na osobu (údaje za rok 2002, zdroj – Ministerstvo zemědělství ČR). Masová produkce jatečných vepřů však s sebou nese všechny nevýhody velkochovů, zejména mohutné horizontální šíření patogenů. Tyto mikroorganismy působí velké ztráty především v chovech selat. Nově narozená selata mají nedostatečně vyvinutý imunitní systém, zejména jeho specifickou složku. Z hlediska humorální imunity jsou zcela odkázána na protilátky obsažené v kolostru. Pokles hladiny mateřských protilátek v době odstavu může vést k různým infekcím a následným ekonomickým ztrátám v chovech. Tyto skutečnosti podněcují intenzivní výzkum imunity a jejího vývoje u selat, stejně jako snahu o vyvinutí účinnějších vakcín.

Kromě hospodářského významu je prase i významným biologickým modelem, zejména z hlediska srovnávací imunologie. Spolu s ostatními kopytníky mají prasata v krevním oběhu vysoké zastoupení T lymfocytů nesoucích T receptor $\gamma\delta$ typu (TCR $\gamma\delta$). Pochopení funkce TCR $\gamma\delta$ lymfocytů u těchto druhů může přispět k obecnému poznání funkcí této u člověka málo prozkoumané a ne příliš početné subpopulace buněk. Další významnou populací T buněk jsou u prasat dvojitě pozitivní CD4⁺CD8⁺ lymfocyty. Dvojitě pozitivní lymfocyty jsou negativní v CD1 znaku a běžně se vyskytují v periferní krvi prasat, kuřat a opic (Zuckermann, 1999), vzácně i u lidí a hlodavců, aniž by však byly známy příčiny a zákonitosti jejich výskytu. U prasat může poměrné zastoupení CD4⁺CD8⁺ buněk na periférii dosáhnout až 60%, přičemž jejich množství roste s věkem. Vzhledem k tomu a k fenotypu těchto buněk jsou většinou autorů pokládány za pomocné paměťové buňky. Navíc je to právě tato subpopulace buněk, která *in vitro* odpovídá na restimulaci již dříve podaným antigenem (Saalmuller et. al. 2002). Jejich přesná úloha a detaily jejich fungování v imunitní odpovědi však zůstávají stále nejasné. Unikátní je také architektura imunitního systému prasat. Ve srovnání s ostatními dosud studovanými druhy má prase zcela obrácenou strukturu lymfatických uzlin a téměř bezbuněčnou eferentní lymfu.

Prasečí imunoglobuliny byly v současné době již detailně prostudovány na genové úrovni. Jakkoli je primární sekvence lidských a prasečích imunoglobulinů vysoce podobná, organizace oblastí kódující segmenty genů pro imunoglobuliny se u prasat značně liší. Navíc stále nebyla zcela uspokojivě zodpovězena otázka, zda prasata nepoužívají ke zvyšování variability Ig repertoáru mechanismus genové konverze, tak jak jej známe například od králíků a kuřat.

Z hlediska vývoje imunitního systému je prase zcela unikátním modelem. U lidí i laboratorních hlodavců prochází imunoglobuliny placentou. U novorozených mláďat tudíž nelze studovat odděleně imunoglobuliny vzniklé postnatálně od imunoglobulinů mateřských. U prasat jsou fěty od mateřského organismu odděleny šestivrstevnou epitelochoriální placentou. Ta je zcela nepropustná pro vysokomolekulární látky včetně imunoglobulinů. Fetální imunitní systém prasat se tudíž vyvíjí prakticky bez interakcí s cizorodými molekulami a tkáněmi - první cizorodé imunitní molekuly dostávají selata až v kolostru. Z experimentálního hlediska má toto uspořádání značnou výhodu. Jsou-li selata odebrána ihned při porodu (nebo hysterektomií těsně před porodem při odchovu bezmikrobních zvířat) získáváme imunologicky naivní modely. V konvenčních podmínkách tato zvířata nepřežívají první setkání s patogeny, včetně jinak neškodných komenzálních mikroorganismů. Při odchovu ve sterilních podmínkách izolátorů však získáváme bezmikrobní (germ free – GF) selata, která jsou unikátním modelem pro studium postnatálního vývoje imunitního systému a jeho interakcí s různými typy patogenů.

Laboratorní hlodavci, kteří jsou nečastějším imunologickým modelem, s sebou nesou některé nevýhody při studiu prenatalního vývoje imunitního systému. Mláďata laboratorních myší se rodí v mnohem nižším stádiu vývoje, než je typické pro primáty. V době narození je hlavní hematopoetická aktivita u myších mláďat soustředěna v játrech. Naproti tomu u selat se hematopoetická produkce z jater přesouvá do kostní dřeně kolem poloviny gestace, což mnohem lépe odpovídá situaci, kterou nacházíme i u lidí. Kromě toho doba gestace prasat (115 dní) je mnohem blíže gestaci u člověka (cca 252 dní). Naopak myši jsou březí pouze 21 dní. Navíc je prase výhodnější z hlediska množství získatelného materiálu (novorozené prase váží kolem 400 g, myš pouze 2 g).

V souladu se stoupajícím významem prasat jako biologického a imunologického modelu se stávají komerčně dostupnými i monoklonální protilátky proti povrchovým molekulám prasečích lymfocytů a jiným imunologicky a biologicky aktivním molekulám. Navíc bylo zjištěno, že některé intracelulární molekuly jsou konzervované napříč druhy a protilátky původně určené proti lidským molekulám křížově reagují s molekulami jiných druhů (např. prasat nebo psů). To umožňuje rychlé a snadné zkoumání prasečích imunocytů metodou průtokové cytometrie.

Význam studia prasat a jejich imunitního systému se dále zvýšil, když - vzhledem k dostupnosti a fyziologickým parametrům - bylo prase určeno jako vhodný dárcce xenotransplantátů pro člověka. V současné době vzniklo několik linií prasat s tzv. „humanizovanými“ geny. Přes značný pokrok v této oblasti se však stále nepodařilo

dosáhnout přijatelné míry tolerance těchto štěpů. Proto je potřebné další zkoumání prasečího imunitního systému a jeho molekul. Další komplikací, která brzdí využívání xenotransplantátů, je možnost přenosu endogenních retrovirů zabudovaných v prasečí DNA do lidské populace a jejich následná reaktivace. Tomuto nebezpečí lze čelit jednak důkladnou sekvenací příslušné DNA, jednak studiem těchto endogenních sekvencí a způsobu, jakým jsou v hostitelském organismu kontrolovány.

2. CÍLE PRÁCE

Ačkoli se v posledních letech stává prase významným experimentálním zvířetem, množství dostupných specifických reagensů určených pro tento model je stále nízké. Stejně tak poznání základních elementů imunitního systému a jejich funkcí pokulhá ve srovnání s množstvím poznatků získaných na již dříve zavedených hlodavčích modelech. Informace získané na hlodavčích modelech přitom nelze beze zbytku extrapolovat na ostatní savčí druhy. Naopak, při studiu imunitního systému různých zvířecích druhů se ukázalo, že existuje celá řada individuálních odlišností, typických pro jednotlivé druhy, nebo skupiny druhů. Příkladem takových rozdílů je vývoj protilátkového repertoáru obratlovců. Zatímco u člověka a laboratorních hlodavců (tzv. PR druhy) vývoj nových B buněk probíhá po celý život jedince a protilátková diverzita je generována přeskupováním genů přímo v primárních krvetvorných orgánech, u mnoha dalších zvířecích druhů (králík, ovce, kur; tzv. GALT druhy) je B lymfopoéza časově omezena, tvorba protilátkového repertoáru je místně oddělena od primárních center hematopoézy a dochází k ní procesem genové konverze. Tento zásadní rozdíl se pak dále zrcadlí v interakcích jednotlivých druhů s mikroflórou (jak komenzální, tak patogenní). Postavení prasete na pomyslném žebříčku PR vs. GALT druhy nebylo dosud zcela objasněno. Má-li ovšem být prase posuzováno z hlediska srovnávací imunologie, je třeba mít napřed dostatek informací o chování, fenotypu, vývoji a funkci základních elementů imunitního systému. Cíly této práce bylo najít odpovědi na některé z těchto problémů:

1. Vytvořit nové druhově specifické monoklonální protilátky s unikátní specifitou.
2. Prostudovat B lymfopoézu a její změny v průběhu ontogeneze prasat, tj.:
 - co nejlépe definovat fenotyp buněk v různých stadiích B lymfopoézy
 - definovat vztah těchto buněk k hematopoetickým centrům
3. Srovnat vývoj B buněk prasat s jinými druhy

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. PRIMÁRNÍ CENTRA KRVETVORBY

Krev zastává u obratlovců primárně funkci přenašeče živin a kyslíku. V průběhu fylogeneze se k této úloze postupně přidávaly i další role. Jednou z nejdůležitějších je u vyšších obratlovců imunita, zajišťovaná bílými krevními buňkami – leukocyty. Přísně vzato jsou leukocyty u většiny savců i jedinými buněčnými elementy v krvi – erytrocyty jsou bezjaderné a trombocyty jsou fragmenty mateřského megakaryocyty. Všechny tyto krevní elementy však pocházejí z jedné původní pluripotentní mateřské hematopoetické buňky (HSC). Místa, kde dochází k proliferaci HSC a diferenciaci dceřinných buněk nazýváme primární centra krvetvorby. V průběhu ontogeneze, zejména v embryonálním stadiu vývoje, není hematopoetické centrum jasně lokalizováno a jeho funkci přebírají postupně jednotlivé orgány. U dospělých jedinců je primárními krvetvorným orgánem především kostní dřeň.

První krevní buňky vznikají z pluripotentních hematopoetických buněk v paraaortální splachnopleure (PAS), která se později diferencuje jako oblast aorty, gonád a mezonefru (AGM). O něco později nalézáme krevní buňky ve žloutkovém vaku (YS). Jedná se jak o erytrocyty (Moore and Metcalf, 1970), tak lymfocyty, respektive jejich prekurzory, identifikované pomocí panleukocytárního antigenu CD45. K dalšímu přesunutí krvetvorby dochází po založení fetálních jater (u myši asi 9. den gestace). U laboratorních hlodavců, jejichž gestace je krátká, si fetální játra drží tuto úlohu až do narození. Naopak u větších druhů savců (včetně prasete a člověka) je v poslední třetině gestace krvetvornými buňkami osídlena kostní dřeň. Ta zůstává pro všechny savce hlavním krvetvorným orgánem v postnatálním období života.

Stejně jako u jiných druhů, i u prasat se první lymfocyty vyskytují ve žloutkovém vaku (YS) jako CD45⁺SWC3^{low} buňky (Sinkora J. et al., 2002). Zároveň již v tomto stadiu dochází k prvním pokusům o přeskupení těžkých řetězců Ig (Sinkora M. et al., 2003). Kolem čtyřicátého dne gestace (DG20) úlohu primárního hematopoetického centra přebírají fetální játra (FL). Kolem DG50 se pak krvetvorba definitivně přesouvá do kostní dřene, kde setrvává po zbytek života zvířete. Z hlediska zastoupení jednotlivých krvetvorných linií je kostní dřeň (BM) hlavním zdrojem B buněk, mezitím co ve fetálních játrech převládá tvorba myeloidních buněk. Těsně před narozením, kolem DG110, nastává i v kostní dřeni prudká expanze buněk myeloidní linie, která zcela překryje obraz tvorby ostatních buněčných typů (Sinkora J. et al.,

2002). Tento nárůst myelopoézy souvisí s přípravou organismu na porod a očekávanou imunitní zátěží.

3.2. HEMATOPOETICKÉ KMENOVÉ BUŇKY

Hematopoetické kmenové buňky (HSC) jsou pluripotentními prekurzory všech krevních buněk. Mají nesmírný proliferační potenciál – u imunitně nekompetentní myši dokáže i pouhá jedna HSC restaurovat celý lymfoidní systém (Osawa et al., 1996). Myši kmenové buňky jsou charakteristické expresí Sca-1, MHC I (H-2K) a naopak nepřítomností markerů jednotlivých linií – Lin⁻ (Sanchez et al., 1996). Lidské HSC jsou typické znakem CD34 a střední expresí c-kit (CD117) a Thy-1 (CD90). Naopak mají jen velmi nízkou nebo vůbec žádnou expresi CD38, HLA-DR, CD45-RA a CD71 (Civin et al., 1993, Visser et al., 1990).

Vzhledem k nedostupnosti protilátek proti CD34 a c-kit byla nomenklatura lymfocytárních prekurzorů v kostní dřeni u prasat postavena na základě SWC markerů (Summerfield and McCullough 1997; Summerfield et al., 2001a, b). Podle tohoto rozlišení jsou granulocyty SWC3⁺SWC8⁺, monocyty SWC3^{high}SWC8⁻ a prekurzory myelomonocytární řady SWC3^{low}SWC8⁻. Summerfield et al. (2003) izolovali pomocí rekombinativního SCF buňky kostní dřene o charakteristickém SSC^{low}FSC^{high} profilu, které byly SWC3⁻SWC8⁻. Tyto buňky postrádaly jakékoli znaky typické pro linie (CD3, CD21), ale exprimovaly mnoho obecných adhezivních molekul (CD11, CD44). Navíc buňky sortované na vazbu s SCF postupně exprimovaly velmi nízkou hladinu SWC3, což je typické pro ranné prekurzory žloutkového vaku a fetálních jater (Sinkora J. et al., 2002). Vzhledem k tomu a k jejich schopnosti formovat kolonie a s přihlédnutím k jejich podobnosti s c-kit pozitivními lidskými prekurzory, lze soudit, že se jedná o pravé prekurzory kostní dřene.

Anatomická lokalizace HSC se mění v průběhu ontogeneze, kdy se populace pluripotentních buněk stěhuje v závislosti na vývoji hematopoetických center. U dospělých jedinců HSC sídlí výhradně v kostní dřeni.

3.3. LINIE KRVETVORBY

Hematopoetické kmenové buňky dávají vznik dvěma základním typům buněčných linií – myeloidní a lymfoidní - v podobě myeloidního a lymfoidního prekursoru (Šterzl, 1993; Lefkowitz, 1996). Zároveň populace HSC obnovuje sama sebe (self-renewing). Schopnost předurčených (committed) prekursorů dávat vznik různým buněčným typům je na všech úrovních diferenciací ovlivněna prostředím a časovým úsekem ontogeneze, v jakém se prekursorová buňka nachází.

Kapacita progenitorů B buněk je tak zcela odlišná ve fetálních játrech a v kostní dřeni dospělé myši (Hardy et al., 1996). Prekursorové buňky jsou také zpětně ovlivňovány lokálními působky různých somatických buněk (lymfocyty, endotel, stroma kostní dřene) a hormony (erythropoetin) v rámci udržení celkové homeostázy organismu.

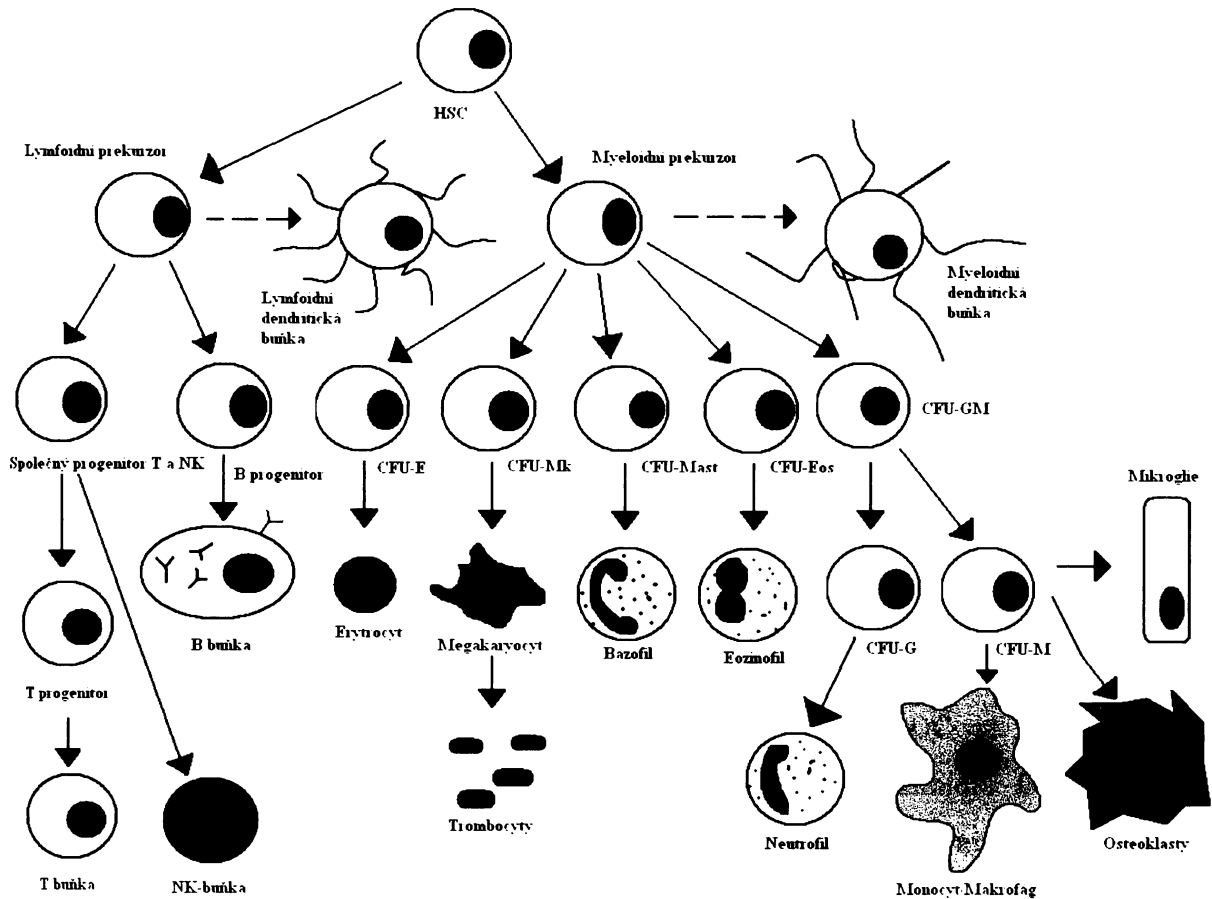
Z myeloidních i lymfoidních prekursorů následně vznikají další předurčené progenitory. Ty byly poprvé identifikovány na základě *in vitro* experimentů, kde dokázaly dát vzniknout koncovým buňkám příslušné linie a byly nazvány jednotkami tvořícími kolonie (Colony Forming Unit, CFU). Společný myeloidní prekursor, nebo také myeloidní kmenová buňka, dává vznik programovaným prekursorům jednotlivých typů granulocytů a monocytů/mkrofágové řady (CFU-Mast, CFU-Eos, CFU-GM), megakaryocytů (CFU-Mk) a erytrocytů (CFU-E) (Obr. 1).

Ze společného lymfoidního prekursoru se napřed odděluje prekursor B linie v podobě pro-B buňky. Druhou větví po odštěpení B linie se stává společný prekursor T a NK buněk. Jeho existence byla dokázána ve fetálním thymu (Carlyle et al., 1997).

3.3.1. MYELOIDNÍ LINIE

Ze společného myeloidního prekursoru se oddělují programované buňky pro vývoj bazofilů (CFU-Mast), eozinofilů (CFU-Eos), myelomonocytární prekursor, společný pro fagocytující leukocyty (CFU-GM) a dále prekursor buněk červené krevní řady (CFU-E) a předchůdce megakaryocytů (CFU-Mk), které dále dávají vznik krevním destičkám. Posledně jmenované mají v krvi jiné fyziologické úlohy, než je imunita a ačkoli jsou zřejmě schopny spolu reagovat s imunitní informační sítí, v dalším výkladu je zanedbáme. Z CFU-GM se záhy oddělují prekursor monocyty/makrofágy (CFU-M) a neutrofilních granulocytů (CFU-G). Buňky monocyt-makrofágové řady nalzáme především v orgánech a tkáních, kde se podílejí na destrukci organismu vlastních buněk, které jsou poškozené nebo nepotřebné, stejně

jako při likvidaci apoptických tělísek. Krom toho hrají tyto buňky významnou úlohu při prezentaci antigenu. K tomuto účelu jsou vybaveny jednak MHC antigeny I. Třídy, tak MHC II a to u všech dosud popsaných druhů savců.



Obr. 1: Schematické znázornění hematopoetických vývojových řad.

Granulocyty dělíme podle pH cytoplazmy a cytoplazmatických granulí (a tedy zbarvení cytoplazmy v důsledku přípravy histologických preparátů) na tři populace. Průměrné zastoupení jednotlivých subpopulací v periferní krvi člověka je 60-70% neutrofilních granulocytů, do 2% bazofilů a 1-3% eozinofilů. Jejich životnost je po vyplavení do periferní krve velmi krátká, mobilizace granulocytů z kostní dřeně je tedy kontinuální proces. Hlavní imunitní úlohou neutrofilních granulocytů je fagocytóza cizorodých mikroorganismů. Fenotypově se od ostatních granulocytárních subpopulací liší především expresí nízkoafinitního receptoru pro IgG (CD16). Mimo to lidské neutrofilní granulocyty nesou znaky CD15, CD87 a jsou MHC II negativní. Eozinofilní granulocyty nesou ve svých cytoplazmatických granulích látky, schopné usmrcovat parazity. Jejich povrchový fenotyp je podobný

neutrofilním granulocytům, pro odlišení těchto dvou linií se používá průkazu látek v eozinofilních granulích. Bazofilní granulocyty jsou typické zejména vysokou povrchovou expresí vysokoafinitních receptorů pro IgE. Všechny granulocyty jsou vybaveny adhezivní molekulou CD11b, nízkoafinitním receptorem pro IgG (CD32), RB isoformou panleukocytárního antigenu CD45 a dalšími obecnými leukocytárními antigeny (CD48, CD53...) a adhezivními molekulami (CD49). Navíc buňky granulocytů a monocyto-makrofágové řady, stejně jako společné progenitorové CD34⁺ buňky nesou molekulu z rodiny SIRP - CD172. Jedná se o integrální membránový protein z imunoglobulinové rodiny, který v intracelulární části obsahuje ITIM motivy a jeho ligandem je CD47 (Jiang et al., 1999).

Kromě těchto krevních elementů odvozujeme od myeloidní krvetvorné linie několik dalších buněčných typů. Jedná se především o myeloidní dendritické buňky (viz. 3.3.1.1.) a dále mikroglie a osteoklasty, jejichž původ spadá do monocyto-makrofágové řady.

3.3.1.1. DENDRITICKÉ BUŇKY

Podle tradičních učebnic imunologie všechny dendritické buňky (DC) pocházejí z progenitorů myeloidní linie. Dnes je ovšem známo, že část DC se vyvíjí z buněk lymfoidních. Podle původu tedy rozlišujeme DC na myeloidní a lymfoidní. Dříve byly tyto dvě linie odlišovány podle exprese CD8 α molekuly, ale během *in vitro* maturačních pokusů se ukázalo, že jak myeloidní tak lymfoidní prekuzory mají schopnost generovat CD8 α pozitivní i negativní buňky (Mantz et al.; 2001). Myeloidní DC jsou početnější a dělíme je dále na Langerhansovy buňky a intersticiální dendritické buňky. Langerhansovy buňky jsou lokalizovány v kůži, především v bazální vrstvě epidermis a v zásadě se jedná o nezralé dendritické buňky. Intersticiální (kožní) dendritické buňky se nachází především v dermis a ve vnitřních orgánech. Lymfoidních dendritických buněk (LDC) je o něco méně (což může být dáno i tím, že lymfoidní prekuzory jsou obecně méně početnější než myeloidní) a nachází se v krvi a sekundárních lymfatických orgánech. LDC můžeme dále dělit podle morfologie nebo místa jejich působení (např. interdigitující DC v thymu).

3.3.2. LYMFODNÍ LINIE

3.3.2.1. NK BUŇKY

Jednou ze tří nejvýznamnějších větví lymfoidní linie jsou NK buňky (přirození zabíječi, natural killers). Tradičně jsou řazeny mezi elementy nespecifické imunity, ačkoli s prohlubujícím se poznáním imunitních dějů se kdysi ostrá hranice mezi přirozenou a adaptivní složkou imunity postupně stírá. V závislosti na imunologickém stavu organismu tvoří NK buňky 5-20% lymfoidních buněk kostní dřeně. Jejich hlavní fyziologickou úlohou je jednak přímá likvidace postižených buněk, jednak cytokinová regulace zánětlivé odpovědi. Ačkoli se jedná o velkou a významnou lymfocytární subpopulaci, otázka jejich diferenciaci ještě není zcela dořešena. Prekurzory NK buněk se zřejmě oddělují od T lymfocytární linie, s kterou sdílejí některé antigeny (CD2). Na rozdíl od T buněk však v NK buňkách nedochází k přeskupení genů pro TCR. Hlavním charakteristickým rysem NK buněk je molekula CCD56 (NCAM-1). Za jistý mezistupeň mezi T lymfocyty a NK buňkami lze snad považovat NK-T buňky (viz. 3.3.2.3.).

3.3.2.2. VÝVOJ T BUNĚČNÉ LINIE

Vývoj buněk T buněčné linie probíhá v převážné většině v brzlíku (thymu). Část T lymfocytů se ovšem vyvíjí i mimo přísně selektivní prostředí thymu (Mabuchi et al., 1998; Tamauchi et al., 1988). Do thymu přicházejí T buněčné prekurzory (pro-thymocyty) z primárních lymfopoetických orgánů. V thymu nejprve dochází k přeskupení β (případně δ – viz. dále) řetězce T buněčného receptoru (TCR). Je-li přeskupení úspěšné, je finální proteinový produkt prezentován na povrchu thymocytu spolu s preTCR α a CD3 komplexem jako pre-TCR. Následně jsou přeskupeny geny pro α (γ) řetězec a na povrchu thymocytů je prezentován finální TCR (řetězce $\alpha\beta$, event. $\gamma\delta$ a CD3). Zároveň T buňky v tomto stadiu exprimují současně CD4 a CD8 antigen. Po přeskupení genů pro T buněčný receptor je finální proteinový produkt (T buněčný receptor), vystavený na povrch T lymfocytu testován na autoreaktivitu (negativní selekce), stejně jako na vazbu k vlastnímu MHC (pozitivní selekce). Přes 97% thymocytů tímto výběrem neprojde a v thymu zahyne apoptózou (Krejsek a Kopecký, 2004). Převážná část buněk osazujících thymus (tzv. thymocytů) patří k $\alpha\beta$ T buňkám (nesou T buněčný receptor $\alpha\beta$ typu). Kromě nich rozeznáváme ještě buňky s $\gamma\delta$

typem T buněčného receptoru. Ačkoli část $\gamma\delta$ T lymfocytů se také vyvíjí v thymu, thymové mikroprostředí zřejmě není pro jejich vývoj zcela nezbytné (Arcangeli et al., 2005) Variabilita $\gamma\delta$ receptorů je relativně nízká (Schondelmaier S., 1993) a většina těchto buněk zřejmě rozeznává jiné molekuly než komplexy MHC s antigenem, například jednoduché nebo bílkovinné organické látky (např. aminy, isoprenoidy, pyrofosfáty; Poupot and Fournie, 2004) vázané na molekuly strukturně podobné MHCI – CD1, MICA nebo MICB. Vzhledem k lokalizaci $\gamma\delta$ T buněk ve sliznicích trávicího traktu a v kůži a navýšení jejich počtu u pacientů s intracelulárními parazity, se předpokládá jejich účast v první obranné linii, na pomezí nespecifické a specifické imunity a to zejména proti intracelulárně parazitickým bakteriím (mykobakterie, salmonela) a proti parazitálním agens (leishmania, plazmodia). Poměrné zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů je u různých živočišných druhů různé. Dále bude pojednáno pouze o majoritních $\alpha\beta$ T lymfocytech.

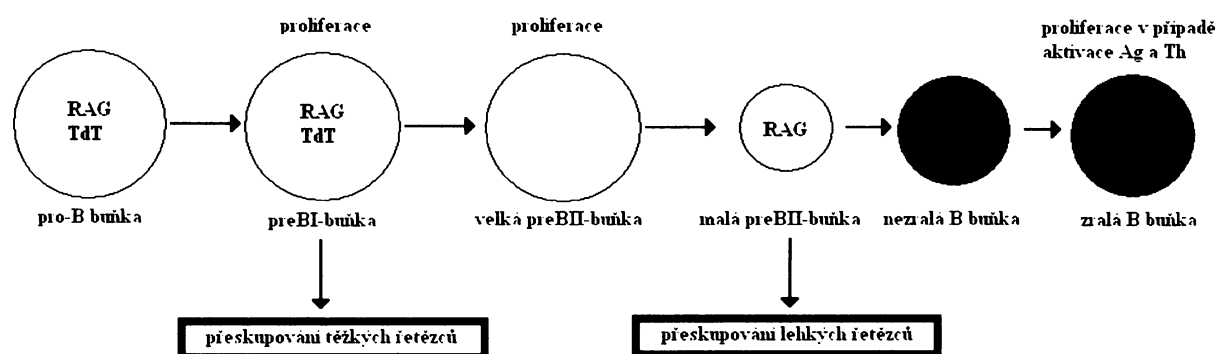
Do thymu přichází programované prekurzory T buněčné linie z fetálních jater nebo kostní dřeně. Migrace těchto CD7 pozitivních prekurzorů je řízena chemokinovými atraktanty a prostřednictvím homingových receptorů. T buněčné progenitory vstupují do thymu kortikomedulárním sinem a rychle migrují do subkapsulární oblasti thymu. Nejranější thymocyty exprimují znaky CD7, CD2 a začínají exprimovat CD5, nikoli však CD4 nebo CD8 – jedná se o dvojitě negativní thymocyty. Vývoj populace dvojitě negativních thymocytů dále probíhá v několika diferenciačních krocích, během nichž se mění exprese molekul CD44 a CD25 (Laurent et al. 2004). Tak $CD4^-CD8^-$ buňky přecházejí od stadia $CD25^-CD44^+$ přes $CD25^+CD44^+$ a $CD25^-CD44^-$, kdy dochází k přeskupování genů pro TCR β až po stadium $CD25^-CD44^-$. Poté co se přeskupí i geny pro TCR α , je celý T buněčný receptor vyjádřen na povrchu buňky, spolu s molekulou CD3. Zároveň se na povrchu thymocytů objevují současně molekuly CD4 a CD8, proto se toto stadium označuje jako dvojitě pozitivní. Tyto buňky navíc exprimují molekuly CD1 a CD69. Subpopulace malých, dvojitě pozitivních buněk tvoří většinu osazenstva thymu. Právě v tomto stadiu procházejí T lymfocyty přísnou pozitivní a negativní selekcí. T buňky které prošly touto selekcí si zachovávají expresi pouze jednoho z koreceptorů CD4 nebo CD8 (podle toho, zda rozeznávají antigen v kontextu MHC II resp. MHC I) – stávají se jednotlivě (single) pozitivními T lymfocyty, které jsou typické pro periferii. Zároveň vyžralé T lymfocyty ztrácejí expresi CD1 a povrchová molekula CD45R0 je nahrazena CD45RA, typickou pro naivní T lymfocyty.

3.3.2.3. NK-T LYMFOCYTY

Kromě těchto hlavních T buněčných typů rozeznáváme ještě populaci tzv. NK-T lymfocytů. Jedná se o lymfocyty s $\alpha\beta$ TCR, s β řetězcem určeným především genem $\beta 11$, které ale navíc nesou celou řadu povrchových molekul typických pro NK buňky. NK-T lymfocyty rozeznávají komplexy CD1d molekul s lipidy a glykolipidy a to jak mikrobiálního, tak vlastního původu. Exprese T koreceptorů CD4 a CD8 je značně heterogenní. U člověka se nacházejí v různých tělních tekutinách a orgánech, zejména v játrech. Jejich přesná fyziologická funkce není dosud známa. Jsou však významným zdrojem cytokinů jak Th1 tak Th2 odpovědi a zřejmě i významným regulátorem rovnováhy mezi těmito dvěma druhy T buněčné reakce. Krom toho jsou po stimulaci galaktosylceramidy schopny ničit virem infikované buňky a buňky nádorových linií (Ko et al., 2005; Smyth et al., 2005).

3.3.2.4. VÝVOJ B BUNĚČNÉ LINIE

Na základě exprese povrchových znaků, intracelulárních proteinů (Osmond, 1993; Melchers et al., 1995) a na základě PCR studií přeskupování genových segmentů (Rolink a Melchers, 1993; Melchers et al., 1995) byla stanovena tato stadia vývoje B buněk v primárních lymfopoetických orgánech: pro-B, pre-B I, velké a malé pre-B II, nezralé B buňky a zralé B buňky (Obr. 2). Posledně jmenované u člověka opouštějí kostní dřeň do krevního oběhu. Po setkání s antigenem dále diferencují a množí se v procesu zvaném afinitní maturace, který probíhá v sekundárních lymfatických orgánech, zejména v mizních uzlinách a ve slezině. Zralé B buňky mohou poté diferencovat na paměťové B lymfocyty nebo plazmatické buňky produkující velká množství imunoglobulinu.



Obr. 2: Schéma vývojové řady B lymfocytů

Jednotlivé vývojové kroky lokalizované v kostní dřeni zahrnují především přeskupování genů pro těžké a lehké řetězce imunoglobulinů a jsou nezávislé na antigenní stimulaci. Progenitorové buňky B linie nesou na svém povrchu panleukocytární znak CD45 - spolu s MHC II a obecným znakem progenitorových buněk CD34. Již ve stadiu pro-B buněk se objevuje exprese molekul, které jsou později součástí B buněčného receptoru (BCR) a to CD79 a CD19 (Sanz et al., 2003; Koyama et al., 1997). Následuje přeskupování genů pro těžký řetězec Ig. Je-li úspěšně dokončeno, buňka postupuje ze stadia pro B do stadia pre-B buněk, které je charakteristické povrchovou expresí těžkého řetězce imunoglobulinu (μ) v komplexu zvaném pre-BCR. Úlohu lehkého řetězce v tomto komplexu zaujímají proteiny VpreB a $\lambda 5$, které jsou u člověka exprimovány z 22. chromosomu (22q11.22 resp. 23). Na stejném místě se nacházejí geny (resp. genové segmenty) pro lehké řetězce imunoglobulinů kappa a lambda. Exprese pre-BCR na povrchu lymfocytu je důkazem, že došlo k úspěšnému a produktivnímu přeskupení genů pro těžký řetězec. Pre-B buňce jsou pak poskytnuty signály, které jí dovolí pokračovat ve vývoji (Bradl et al., 2003). U lidských B lymfocytů jsou v tomto stadiu exprimovány molekuly CD10 a CD38. U prasat jejich přítomnost dosud nebyla prokázána, protože dosud nebyly vytvořeny spolehlivé specifické monoklonální protilátky (MoAb) proti těmto proteinům. V tomto stadiu buňka začíná přeskupovat geny pro lehké řetězce Ig. Po úspěšném přeskupení se na povrchu exprimuje kompletní B buněčný receptor. U lidí je v tomto stadiu exprimována také molekula CD40. Nezralé B buňky procházejí negativní selekcí při níž jsou zlikvidovány buňky s afinitou k vlastním tkáním a nakonec opouštějí kostní dřeň ve stadiu zralých B buněk, které kromě IgM na povrchu nesou i IgD molekuly. U prasat k expresi IgD nedochází, protože příslušný gen se u prasete nevyskytuje (Butler, 1997). Rozlišení B buněk v tomto stadiu tedy není tak přesné.

Jako markery vývojových stadií B lymfocytů lze použít i rekombinázy Rag-1 a Rag-2 a enzym terminální deoxynukleotidyl transferázu (TdT), které jsou aktivní v průběhu přeskupování genových segmentů genů pro lehké a těžké řetězce imunoglobulinů.

Růstovými faktory B lymfocytů jsou v kostní dřeni SCF (Stem Cell Factor) a později IL-7.

3.3.2.4.1. MOLEKULA CD2

CD2 (LFA-2) je molekula patřící do imunoglobulinové strukturní skupiny s adhezivní funkcí. Původně byla pozorována při tzv. rosetové reakci, kdy docházelo ke shlukování ovčích erytrocytů lidskými T lymfocyty a byla tedy popsána jako receptor pro xenogenní erytrocyty (Moingeon et al., 1989). Jejím normálním ligandem je u krysu CD48 a u lidí CD58, adhezivní GPI-vázané proteiny. Zprostředkování adhezivní interakce CD2 je součástí aktivace přes TCR, s nímž je CD2 v komplexu (van der Merwe and Davis, 2003). Stejně jako u NK buněk je i zde signální dráha CD2 spjata s CD3 podjednotkou ζ (Moingeon et al., 1992). Strukturní homologie CD2 mezi různými savčími druhy je pozoruhodná (Davis and van der Merwe, 1996). Naproti tomu distribuce na různých populacích lymfocytů u různých druhů se velmi liší. U ovcí a skotu se CD2 nachází pouze na subpopulacích $\alpha\beta$ T lymfocytů (Giegerich et al., 1989; Mackay et al., 1989). Oproti tomu je distribuce CD2 u myši mnohem širší. CD2 nesou nejen všechny myši T buňky (Sen et al., 1989), ale i všechny B buňky ve slezině a periferní krvi exprimují nízké hladiny CD2 (CD2^{low}). Expresi CD2 přitom lze zachytit již v časném stadiu B lymfopoézy, ve stadiu pre-B buněk, přičemž exprese CD2 předchází povrchové expresi imunoglobulinu (Sen et al., 1990). U laboratorních potkanů a u lidí se CD2 vyskytuje na všech T lymfocytech a na NK buňkách (Spruyt et al., 1991). Na lidských B buňkách se molekula CD2 nevyskytuje, ale lze jí nalézt v případě některých B buněčných malignit, což podporuje hypotézu, že se přechodně objevuje v průběhu B buněčné diferenciaci (Muraguchi et al., 1992). V poslední době se ale objevují práce, v nichž je popisována minoritní populace nemaligních B buněk s expresí CD2 (Kingma et al., 2002).

O prasečích B lymfocytech se původně předpokládalo, že jsou CD2 negativní a to jednak na základě neschopnosti B lymfocytů tvořit rozety (Jarošková a Kovářů, 1978) a později i na základě přímého důkazu (Binns et al., 1992). Poté co byla vytvořena protilátka proti prasečímu CD3 a bylo umožněno jemnější rozdělení lymfocytárních populací se však ukázalo, že alespoň část prasečích B buněk je CD2 pozitivní (Yang and Parkhouse, 1996; Bischof, 1996). V roce 1998 potom Šinkora J. et al. dokázali metodou průtokové cytometrie pomocí citlivějšího dvojího značení s fykoerytrinem, že prasečí B buňky (IgM⁺) se dělí do dvou populací, CD2⁺ a CD2⁻. Zastoupení těchto dvou subpopulací se přitom v průběhu života prasete dynamicky mění. Ihned po narození a u bezmikrobně chovaných selat se na periférii vyskytují prakticky pouze CD2 pozitivní B buňky. V průběhu postnatálního období se u prasat vyvíjí výrazná populace IgM⁺CD2⁻ buněk. Vzhledem k tomu, že se tato subpopulace

u bezmikrobně chovaných zvířat objevuje až po osazení bakteriální směsí, mohlo by se jednat o aktivované B buňky.

3.3.2.4.2. MOLEKULA CD19

Molekula CD19 je 120 kD transmembránový glykoprotein a je charakteristickým znakem B lymfocytů a všech jejich vývojových stadií s výjimkou plazmatických buněk (Sato et al., 1997). Přítomnost dvou C2 domén v extracelulární části ji řadí k imunoglobulinové proteinové nadrodině. CD19 asociuje s CD21 a CD81 komponentami BCR a podílí se na intracelulárním přenosu a zesilování signálu. V ontogenezi B buněk se objevuje záhy, již ve stadiu pozdních pro-B buněk, kde dochází k přeskupování genů pro těžké řetězce Ig a je zcela nezbytná pro vývoj a funkci B buněk (Otero and Rickert, 2003). Z tohoto důvodu je exprese CD19 zachována i na leukemických buňkách odvozených z B buněčné řady (s výjimkou myelomů) a je často využívána jako diagnostický znak tohoto typu leukémií. U dosud studovaných druhů jsou některé domény CD19 vysoce homologní (>90%), přičemž nejvyšší homologii nacházíme v C-terminální intracelulární signalizační části proteinu. Extracelulární část proteinu vykazuje podstatně větší mezidruhovou variabilitu. Z toho důvodu je křížová reaktivita protilátek vyvinutých proti lidské CD19 molekule s ostatními druhy velmi nízká.

3.3.2.4.3. MOLEKULA CD79

Heterodimery transmembránových glykoproteinů CD79 α a β (dříve Ig α a Ig β) jsou exprimovány na povrchu všech B buněk včetně všech vývojových stadií, počínaje rannými progenitory (pro-B). V souladu s tím lze tyto antigeny detekovat jak v primárních hematopoetických orgánech, tak v periferní krvi. Jedinou výjimkou jsou terminálně diferencované plazmatické buňky, z nich mohou v rámci diferenciaci CD79 antigeny zmizet současně s BCR komplexem. Exprese CD79 je detekovatelná již v cytoplazmě nejranějších prekurzorů B řady. Vzhledem k neschopnosti detekovat CD79 na povrchu buněk B linie ve stadiu dřívějším než pre-B se soudilo, že CD79 zůstává v cytoplazmě pro-B buněk až do přeskupení genů pro těžký řetězec (Okazaki et al., 1993; Ishihara et al., 1992). Objevují se však i práce, které popisují povrchovou expresi CD79 β již ve stadiu pro-B (Koyama et al.,

1997). Nicméně úloha CD79 pro vznik antigenně specifického receptoru je zřejmě nezastupitelná, protože v případě myši postrádajících geny pro CD79 se maturace B lymfocytů zastaví ve stadiu pro-B a IgM není prezentován na povrchu buněk, ačkoli dochází k produktivnímu přeskupování genů pro VDJ domény (Pelanda et al., 2002).

Jako součást B buněčného receptoru je komplex CD79 odpovědný jednak za transport sIgM na povrch buněk, tak především za transdukcii signálu generovaného BCR (Venkitaraman et al., 1991). Antigenní receptor sIgM zasahuje do cytoplazmy pouze krátkým úsekem, jeho spojení s kinázami a signální dráhou zajišťují právě heterodimery CD79 α /CD79 β . Signalizace je zajišťována přes motivy ITAM v cytoplazmatických částech CD79 molekul, přičemž fosforylace tyrozinu je negativně regulována fosforylací jiných částí CD79 molekuly serin/threoninovými kinázami (Muller et al., 2000). Důkazem toho jsou také některé malignity, jako například B-chronická lymfoidní leukémie, kde defekty CD79 vedou k inaktivaci BCR (Cragg et al., 2002;). Naopak těžké řetězce IgA, IgG a IgE, které mají mnohem delší cytoplazmatickou část jsou zřejmě schopny částečně nahradit některé funkce CD79 (Knight et al., 1997). V případě IgG1 je zřejmě tato funkce zcela fyziologická pro paměťové B buňky. Myši, které postrádají geny pro membránovou formu těžkých řetězců gamma 1, nejsou schopny tvořit ani protilátkovou odpověď typu IgG1 ani paměťové B buňky tohoto typu (Kaisho et al., 1997). Další důležitou úlohou heterodimeru CD79 je transport sIgM na povrch a naopak transport pohlceného antigenu do lysozómů (Li et al., 2002), kde je zpracován k následné prezentaci.

Molekula CD79 se u lidí běžně využívá k diagnostice leukémií (Chu and Arber, 2001) a je tedy k dispozici mnoho komerčně vyráběných klonů monoklonálních protilátek jak proti α tak proti β řetězci.

3.3.2.4.4. ONTOGENZE DIVERZITY REPERTOÁRU B BUNĚK

Velká diverzita rozpoznávacích epitopů je specifickým znakem adaptivní imunity. Přesný počet variant imunoglobulinů o různých specifitách nelze přesně určit (vzhledem k působení TdT). U člověka se teoreticky odhaduje na 5-10 milionů možných kombinací. To ovšem platí, pokud jsou používány všechny genové segmenty (tedy u člověka přes 150 V_H , 12 D_H a 4 J_H). U některých druhů teplokrevných obratlovců je však situace odlišná. Krajním případem jsou kuřata, která mají pouze jeden V_H segment. Přesto protilátky produkované těmito druhy nepostrádají značnou diverzitu a kvalita humorální odpovědi je zcela srovnatelná

s ostatními druhy. Bližší zkoumání tohoto a příbuzných fenoménů dalo vzniknout teorii PR a GALT druhů.

3.3.2.4.5. MODEL PR

Pod pojmem PR druhy spadají modely primátů a laboratorních hlodavců. Jedná se o nejvíce a nejdéle zkoumané druhy teplokrevných živočichů. Z tohoto důvodu je tento typ vývoje repertoáru B buněk obvykle popisován v učebnicích a je v hrubých rysech popsán i v kapitole 3.3.2.4. U druhů spadajících pod PR model se základní diverzita B buněčného repertoáru odehrává v primárních krvetvorných orgánech, kterými jsou nejprve játra a později kostní dřeň. Vývoj nových B buněk – spolu s ostatními krevními buňkami - v kostní dřeni přitom probíhá po celý život organismu (Rossi et al, 2003). Výjimku tvoří pouze T lymfocyty jejichž dozrávání probíhá v thymu. Diverzita je generována pouze přeskupováním genů pro těžké a lehké imunoglobulinové řetězce a u genů pro těžké řetězce ještě činností TdT. K novému přeskupování imunoglobulinových genů však u aktivovaných buněk dochází i na periférii. V rámci afinitní maturace v lymfatických uzlinách a slezině může dojít k opětovné aktivaci genů pro rekombinázy RAG 1 a 2. I u takto vytvořených klonů je však veškerá rozmanitost imunoglobulinového repertoáru vytvářena pouze pomocí přeskupování jednotlivých VDJ segmentů.

3.3.2.4.6. MODEL GALT

Mezi GALT druhy řadíme z imunologického hlediska relativně dobře prozkoumané kuře, králíka a ovci. Zřejmě sem alespoň částečně patří i skot a prase. Vývoj B buněčného repertoáru probíhá výhradně ve specializovaném orgánu. U ptáků je to Fabriciova burza, u savců více či méně specializované lymfoidní tkáň asociovaná se střevem (GALT). Nejprostudovanější je ontogeneze B buněk u kuřat. Fabriciova burza je osídlena progenitorovými buňkami, které jsou programovány pro vytvoření B linie. Tyto buňky pocházejí z kostní dřene a jsou do burzy přesunuty v jedné jediné vlně mezi 8. a 14. dnem gestace. V tomto specializovaném orgánu dochází ještě během embryonálního života a krátce po narození k vývoji B buněčného repertoáru. Přibližně v půl roce života jedince Fabriciova burza zaniká a s ní i další vývoj B buněk. Zvíře pak má až do konce života k dispozici pouze

přeskupení, vzniklá během poměrně krátkého období fungování burzy. Zatím nebylo zcela uspokojivě objasněno, zda některé z těchto periferních B lymfocytů mají či nemají proliferační potenciál (Weill and Reynaud, 1998).

Dalším rozdílem oproti PR druhům jsou poněkud odlišné mechanismy jakými se tvoří protilátková diverzita. Stejně jako u primátů a hlodavců zde dochází k přeskupování genů pro imunoglobuliny. Jak již však bylo zmíněno v úvodu této části, ve hře je v tomto případě mnohem méně použitelných genových segmentů. Tak například prasata mají jen 20 V_{H1} segmentů, 2 D_{H1} a pouze jeden J_{H1} segment. V genomu kuřat je jediný V_{H1} gen, ostatní jsou pseudogeny. U králíků sice existuje pře 200 V_{H1} segmentů, skutečně je však využíván pouze omezený počet, navíc je přednostně používán V segment, který je nejbliže první D_{H1} sekvenci. Z důvodů malé kapacity genomu jsou produkty vzniklé genovým přeskupením mnohem uniformnější než je tomu u člověka. K rozrůznění protilátkového repertoáru je tak třeba dalších mechanismů. Činnost TdT je zde nahrazena jistou volností při spojování VDJ segmentů, čímž vznikají unikátní sekvence. Hlavním zdrojem variability je ale genová konverze, kdy u již přeskupených genů dochází pomocí homologní rekombinace k výměně jednotlivých úseků za pseudogeny.

U savců, kde se Fabriciova burza nevyvíjí, se tyto procesy odehrávají v jiných, ne tak přísně specializovaných orgánech. U králíků je to apendix, u ovcí Peyerské pláty ilea. U králíků (Lanning et al., 2000) -a do jisté míry i u ovcí (Maybaum and Reynolds, 1996)- bylo navíc prokázáno, že u gnotobioticky chovaných zvířat ke genové konverzi a diverzifikaci repertoáru vůbec nedochází. Další pokusy ukázaly, že pro úspěšný průběh vyžívání B lymfocytů je nezbytná mikrobiální kolonizace střeva. Na druhou stranu, taková kolonizace vyvolá prudké změny i v lymfoidních tkáních střeva u kryš (Yamanaka et al., 2003), které jako hlodavci jednoznačně patří do PR skupiny. U jehňat byl prokázán vliv prenatální splenektomie na vývoj B buněk (Press et al., 2001), nedochází však k absolutní depleci populace. Studie dokazující vývojovou závislost prasečích B lymfocytů na Peyerských plátech ve střevě zatím prokázaly pouze zvýšenou míru apoptózy B lymfocytů v těchto strukturách, přesvědčivý důkaz však nepodaly (Andersen et al., 1999). Na druhou stranu je známo, že Peyerské pláty ilea zanikají během prvního roku života prasete. Pokud jsou skutečně místem tvorby a selekce repertoáru Ig, znamenalo by to, že tato tvorba je časově omezena (Butler, 1997). Také kolonizace selat po narození výrazně ovlivňuje diferenciaci a reaktivitu všech imunitních buněk, tedy i B lymfocytů (Butler et al., 2002). Stejně tak nelze zcela jednoznačně říct, jestli u starších prasat dochází k pokračování B lymfopoézy, či k její zástavě.

Není tedy vyloučeno, že další výzkum ontogeneze lymfocytů přinese nové poznatky, které přispějí k rozostření takto narýsované hranice mezi PR a GALT druhy. Je dost možné, že lidský a myší model na jedné a kuřecí na druhé se ukáží jako krajní varianty vývoje B buněk a protilátek a většina ostatních druhů se bude pohybovat někde mezi těmito krajnostmi.

3.4. GNOTOBIOLOGIE

Jak již bylo řečeno v úvodu této práce, důležitým modelem pro výzkum ontogeneze imunitního systému jsou bezmikrobně odchovaná zvířata a to ze dvou důvodů. Mláďata pro gnotobiologický odchov se získávají metodou otevřené hysterektomie březí samice (Miniats et Jol, 1973). Děloha i s plody je proložena prokladačem do sterilního odchovného tanku. Mláďata tak nepřijdou do styku s matkou a tedy ani kolostrem a mateřským mlékem, které je pro všechny savce významným zdrojem protilátek (Kelleher et al. 2001; Tizard 2001) a dalších imunologicky aktivních substancí. Proto je možné u takto odchovaných mláďat pozorovat vývoj imunitního systému bez postnatálního ovlivnění mateřskými imunitními a imunomodulačními látkami. Mláďata jsou odchovávána ve zcela bezmikrobním prostředí sterilizátoru; při kontaktu s cizorodými mikroorganismy (i nepatogenními) není jejich imunitní systém schopen zvládnout náhlou zátěž a zvířata obvykle hynou. V průběhu let však byly definovány neškodné bakteriální směsi (Sarma-Rupavtarm et al., 2004; Salzman et al., 2002; Dewhirst et al., 1999), kterými lze zvířata v izolátoru snadno osadit a převést je tak do konvenčních podmínek (zvířata jsou po tomto zákroku schopná života mimo izolátor). V takovém uspořádání poskytuje gnotobiotický model jedinečnou příležitost studovat vliv mikroorganismů na vývoj imunitního systému a interakci imunitního systému v různém stádiu vývoje s komenzálními a patogenními mikroby.

3.5. PRASE JAKO IMUNOLOGICKÝ MODEL

Jak již bylo řečeno v úvodu této práce, prase patří mezi významné biologické modely, důležité zejména z hlediska vývojové a srovnávací biologie a imunologie. Oproti nejčastěji používaným modelům (člověk, hlodavci) má však několik výrazně odlišných, specifických vlastností. Hlavní z nich je obrácená struktura lymfatických uzlin (Binns, 1982). Vzhledem k tomu eferentní lymfa prakticky neobsahuje lymfocyty. Ty vstupují z lymfatických uzlin rovnou do krve. Na rozdíl od ostatních zkoumaných živočichů také prasati chybí funkční gen pro IgD. Navíc má omezený repertoár genových segmentů, kódujících variabilní části imunoglobulinů. Pro diverzifikaci primárního repertoárů tedy pravděpodobně používá genovou konverzi (Butler et al., 1996). Periferní krev prasat obsahuje dvě subpopulace T lymfocytů s neobvyklým fenotypem – $\gamma\delta$ T buňky a $CD4^+CD8^+$ dvojitě pozitivní T lymfocyty. Z hlediska studia prenatálního imunitního systému má velký význam šestivrstvá epitelochoriální placenta, která tvoří nepropustnou vrstvu, zabraňující průchodu jakýchkoli vysokomolekulárních látek z těla matky do krevního oběhu plodu (Sterzl and Silverstein, 1967)

3.5.1. MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY PROTI POVRCHOVÝM MOLEKULÁM PRASEČÍCH LYMFOCYTŮ

Prase se stává čím dál tím častějším a oblíbenějším biomedicínským experimentálním modelem. Spolu s jeho využíváním v biologii a zejména imunologii roste potřeba dostupných monoklonálních protilátek a jiných specifických reagensů namířených proti prasečím antigenům. Některé z povrchových antigenů prasečích leukocytů jsou vysoce homologní s lidskými a/nebo myšími diferenciačními CD antigeny (např. prasečí CD40 se váže na lidský CD154 – Rushworth et al., 2000). Mnoho jiných CD znaků sice nesdílí tak vysokou homologii, ale s jistotou lze říci, že se jedná o analogy jejich lidských (myších) protějšků. Například podobnost v uspořádání MHC antigenů je taková, že prasečí transplantační antigeny byly pojmenovány SLA (Swine Leucocyte Antigens) podle lidských protějšků (HLA – Human Leucocyte Antigens). Pro část povrchových molekul prasečích leukocytů však dosud nebyly nalezeny odpovídající protějšky. Tyto antigeny dostaly označení SWC (Swine Workshop Cluster) a dosud jich bylo popsáno devět (SWC1-9) (Lunney, 1993; Saalmuller, 1996; Haverson, 2001). SWC3 byl Alvarezem et al. (2000) určen jako člen SIRP rodiny signálních regulačních proteinů. Právě použitím SWC3 v kombinaci s SWC1 a SWC8 lze

jednoznačně charakterizovat hlavní populace periferních lymfocytů v prasečí krvi (Tab. 1) (Saalmuller, 1996; Haverson et al., 1994; Lunney, 1993). Pomocí SWC3 a SWC8 antigenů lze také rozlišit buňky kostní dřeně, jak bylo popsáno v oddíle 3.2.

3.5.2. MYELOMONOCYTÁRNÍ LINIE

K diferenciaci vývojové myelomonocytární větve dále kromě antigenů SWC3 a SWC8 použili Summerfield a McCullough (1997) povrchové znaky, které se používají k rozlišení vývojových stadií u člověka a myši – CD14, CD16, CD44, MHC (SLA-DR) a β -integriny. V průběhu vývoje se zvyšuje exprese SWC3 a SWC8, stejně jako CD14 a 16. Expresí adhezivní molekuly CD44 a integrinů se periodicky mění, přičemž minima dosahuje ve stadiu oddělení monocytární a myeloidní diferenciací řady. Již nejprimitivnější myelomonocytární prekurzory jsou SWC3⁺ a exprimují na svém povrchu SLA-DR ve střední až vysoké hustotě. Z tohoto prekurzoru se oddělují myeloidní a monocytární diferenciací větve. Neutrofilové zvyšují hustotu SWC8 a naopak ztrácejí SLA-DR.

Populace	Subpopulace	SWC1	SWC3	SWC8
Granulocyty	Neutrofilové	+	+	+
	Eozinofily	-	+	+
	Bazofily	+	+	+
	Monocyty/makrofágy	+	+	-
Lymfocyty	T buňky	+	-	+/-
	B buňky	-	-	+

Tab. 1. Rozdělení subpopulací leukocytů periferní krve prasat podle exprese SWC antigenů.

Naopak získávají CD14, který se u progenitorů nevyskytuje. Expresí tohoto antigenu se dále zvyšuje, až do stadia zralých neutrofilů SWC3⁺SWC8⁺CD14⁺, které jsou již schopny metabolického vzplanutí. V průběhu dozrávání se zmenšuje velikost a částečně i granularita těchto buněk. S tím koreluje i exprese adhezivní molekuly CD44 a CD16.

Monocytární diferenciací linie je charakterizována především absencí znaku SWC8. Jejich postupné vyžívání je charakterizováno jednak zmenšováním objemu a zároveň zvyšování exprese SWC3 (SWC3^{low} → SWC3^{hi}). Zralé monocyty nesou znak CD14.

3.5.3. T LYMFOCYTY

Stejně jako u všech ostatních druhů, nesou prasečí lymfocyty T buněčný receptor a s ním spojený znak CD3, který je používán jako hlavní marker T linie (Yang and Parkhouse, 1996). Z hlediska typů TCR nalézáme u prasat oba typy – $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$. Podrobná charakteristika jednotlivých populací T lymfocytů podle povrchové exprese je uvedena v tabulce 2 (Podle Yang a Parkhouse, 1996). Dále se podrobněji věnují dvěma unikátním subpopulacím T buněk, které se u ostatních studovaných druhů běžně na periférii nevyskytují – $\gamma\delta$ T buňkám a $CD4^+CD8^+$ dvojitě pozitivním T lymfocytům.

TCR	CD2	CD4	CD8	Subpopulace
$\alpha\beta$	+	+	-	T_H pomocné T lymfocyty
	+	-	hi	T_C cytotoxické T lymfocyty (CTL)
	+	+	low	T_H paměťové (aktivované) pomocné T lymfocyty (DP)
	+	-	-	???
$\gamma\delta$	+	-	lo	Buňky s cytotoxickou aktivitou
	+	-	-	???
	-	-	-	Populace převažující v periferní krvi

Tab. 2. Členění jednotlivých subpopulací T lymfocytů podle povrchového fenotypu

3.5.3.1. UNIKÁTNÍ TYPY T LYMFOCYTŮ V PERIFERNÍ KRVI PRASAT

První z unikátních periferních subpopulací jsou $\gamma\delta$ T lymfocyty. Zatímco u člověka je množství $\gamma\delta$ T buněk kolísavé (v závislosti na imunologickém stavu jedince) a u většiny zdravých lidí se jedná o marginální populaci převážně intraepiteliálních lymfocytů, u kopytníků (včetně prasat) jsou krom epitelii $\gamma\delta$ T buňky hojně zastoupeny jak na periférii, tak v cirkulaci (Yang and Parkhouse, 2000). Všechny prasečí $\gamma\delta$ T buňky jsou CD4 negativní. Podle exprese znaků CD2 a CD8 je lze rozdělit do tří subpopulací (viz. Tab. 2) Funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů jsou zřejmě velmi rozmanité. $CD2^+CD8^{low}$ $\gamma\delta$ T buňky vykazují cytotoxickou aktivitu (Yang a Parkhouse, 1997). V periferní krvi je nejčastější subpopulace $CD2^+CD8^-$, jejíž polyklonální aktivaci lze získat zabíječské buňky výše zmíněného fenotypu. Populace $\gamma\delta$ T buněk se u dříve vakcinovaných selat aktivuje po restimulaci mykobakteriálními antigeny

(Lee et al., 2004). Podobně se chovají při pokusech se spirochetálními antigeny (Hontecillas et al., 2003). Tyto pokusy však zároveň ukázaly, že $\gamma\delta$ T lymfocyty jsou stimulovovány IL-2 i bez přítomnosti antigenu, což ukazuje na méně přísnou regulaci, než jaké podléhají $\alpha\beta$ T buňky. Část z těchto cirkulujících buněk dokonce exprimuje povrchové antigeny, dosud spojované s antigen prezentujícími buňkami a jsou schopny pohlcovat solubilní antigeny (Takamatsu et al., 2002).

Další významnou T lymfocytární populací v periferní krvi prasat jsou tzv. dvojitě pozitivní lymfocyty. Jedná se o $CD3^+\alpha\beta^+$ T lymfocyty, které na membráně exprimují zároveň CD4 a CD8 antigeny. Přitom ale u nich nelze detekovat expresi CD1, což je odlišuje od dvojitě pozitivního vývojového stadia thymocytů. Velikost této populace roste s věkem zvířat a je závislá na antigenní stimulaci (Zuckerman and Gaskins, 1996). Celkové množství dvojitě pozitivních buněk v krvi dospělého prasete se může pohybovat až kolem 60% (Saalmuller et al., 1987) U dosud studovaných druhů se v takové míře dvojitě pozitivní T buňky v periferní krvi nevyskytují, přibližují se tomu snad jen kuřata (20-40%) a opice (5-25%) (Luhtala et al., 1997; Zuckermann, 1999). Právě vzhledem k poměrně hojnému výskytu těchto buněk u opic je poměrně překvapivá jejich nízká frekvence u jim vývojově blízkého člověka (Blue et al., 1985). Nicméně důkladné studie o vysoké citlivosti přinášejí důkazy o existenci dvojitě pozitivních periferních buněk u dalších a dalších druhů (Kenny et al., 2004). Přesná funkce těchto lymfocytů zůstává stále poněkud nejasná, ačkoli většina autorů se přiklání k názoru, že se jedná o aktivované/paměťové pomocné buňky (Saalmuller et al., 2002; Zuckermann, 1999).

3.5.4. B LYMFOCYTY

V současné době je k dispozici široký panel monoklonálních protilátek proti povrchovým znakům prasečích B lymfocytů (Boersma et al., 2001). Stejně jako B lymfocyty ostatních druhů, i prasečí B buňky jsou tradičně děleny podle exprese CD5 (Appleyard and Wilkie, 1998). Oproti tomu podle Šinkory J. et al. (2002) všechny prasečí B buňky jsou $CD5^{low}$. Tento rozpor patrně spočívá v rozdílném stáří selat, která byla použita jednotlivými skupinami k pokusu (dospělá zvířata – Appleyard - vs. fěty a novorozenci – Šinkora J.). To by odpovídalo i myšimú modelu, kde se $CD5^+$ populace zakládá prenatalně a později je víceméně překryta pozdější $CD5^-$ populací.

Na rozdíl od údajů, které jsou známy ze studia ostatních druhů, prasečí B lymfocyty vykazují na svém povrchu jinak typicky T lymfocytární znak – CD2 (Sinkora et al., 1998). Jeho exprese je jen velmi nízká a lze ji spolehlivě prokázat jen metodou dvojího značení. Tento znak se přitom na prasečích lymfocytech objevuje již ve stadiu velkých preB II buněk (Sinkora et al., 2002).

Vzhledem k nedostupnosti anti-prasečích protilátek proti typickým prekurzorovým antigenům, které se používají u jiných druhů (CD34, CD19) byly nejčasnější prasečí prekurzory definovány jako CD45⁺SWC3^{low} buňky. Jak již bylo řečeno dříve (3.5.2.), SWC3 je u prasat typickým povrchovým znakem granulocytů. Na nízké úrovni je však exprimován i časnými prekurzory lymfocytů a to až do stadia preB-I. Studium těchto nejčasnějších B prekurzorů však stále naráželo na neexistenci specifického markeru, který by spolehlivě určil příslušnost buněk k B linii. Sinkora et al. (2002) využil pro spolehlivou identifikaci členů B buněčné řady komerční anti-lidskou monoklonální protilátku proti CD79 α (HM57, Dako Cytomation Jones et al., 1993), namířenou proti intracelulární C-terminální části proteinu mezi aminokyselinami 202-216. Tato protilátka, původně připravená pro diagnostické účely, je specifická proti buňkám lidské B linie včetně některých B buněčných malignit. Zajímavé však je, že při testech na tkáňových řezech tato protilátka křížově reagovala i s B buňkami jiných savčích druhů včetně prasete (Mason et al., 1991). Křížová reaktivita je zřejmě způsobena vysokou homologií cytoplazmatické domény CD79 α napříč savčími druhy. V předběžných experimentech z roku 2002 se potvrdilo, že tato protilátka reaguje s prasečími B lymfocyty i při užití v průtokové cytometrii. Mezidruhová křížová reaktivita při použití metody průtokové cytometrie byla prokázána i úspěšným použitím proti kočičím B buňkám (Harley et al., 2003).

Kromě výše zmíněných byly na povrchu prasečích B buněk prokázány molekuly CD1, CD21, CD25, SWC7 a SWC8 (Denham et al., 1994; 1998)

3.5.4.1. VÝVOJ REPERTOÁRU PRASEČÍCH B BUNĚK

Z hlediska vývoje B buněk je nejdůležitější událostí správné přeskupení genových segmentů genů pro imunoglobuliny. K přeskupování dochází v průběhu vývoje B buňky dvakrát, zvláště pro těžké a lehké řetězce imunoglobulinů a výsledný produkt musí být smysluplný, ve správném čtecím rámci a nesmí obsahovat žádné stop-kodony. Buňky, které v těchto krocích neuspějí, dostávají signál k apoptóze a hynou. U prasat, která mají pouze jeden J_H segment, se mohou buňky o úspěšné přeskupení pokusit pouze jednou na každém lokusu. Pravděpodobnost úspěchu je pak 33% pro každý lokus (teoreticky u dvou třetin buněk dojde k posunu čtecího rámce, je-li proces přeskupování skutečně čistě náhodný). Pravděpodobnost úspěchu při přeskupování genů pro lehké řetězce je pak mnohem vyšší, protože pro přeskupování jsou k dispozici dvě sady genů – κ a λ . Navíc genové segmenty pro lehké řetězce jsou uspořádány v tandemech a během přeskupení tak nedochází ke ztrátě rekombinačních signálů jako v případě těžkých řetězců. Produktivní přeskupení lehkých řetězců se tak podaří téměř každé buňce, navíc se může opakovat i v průběhu života buňky při tzv. germinální reakci. Limitující je tedy přeskupování těžkých řetězců. Jen asi 55% buněk, které zahájí přeskupování projdou sítí výběru, ostatní jsou eliminovány. Přitom se části těchto buněk podařilo úspěšně přeskupit geny již na prvním lokusu a druhý lokus zůstává v zárodečné konfiguraci. Druhá část buněk provedla produktivní přeskupení až na druhý pokus a neúspěšně přeskupený první lokus je mimo čtecí rámec (out-frame), případně obsahuje stop kodon (Sinkora et al., 2003). Tyto buňky jsou dále testovány na autoreaktivitu, přičemž prakticky všechny autoimunní buňky zahynou. Zvláštní výjimku z tohoto pravidla tvoří malá populace B buněk, která osidluje thymus. Zdá se, že tyto buňky nepodléhají žádné selekci. Lze mezi nimi nalézt jak buňky s neproduktivním přeskupením na obou lokusech, tak buňky které produkují autoreaktivní imunoglobuliny. Navíc ve fetálním thymu dochází normálně k produkci přirozených protilátek (Cukrowska et al., 1996). Funkce těchto aberantních B buněk v thymu není dosud přesně známa. Vzhledem k tomu, že imunoglobuliny jsou nejhojnější proteiny krevního séra, se obecně soudí, že úkolem těchto buněk je výroba protilátek, které – byť autoreaktivní – slouží jako zdroj antigenů pro selekci T buněk v thymu.

Další zajímavou a dosud ne zcela vyřešenou otázkou je, zda u prasat dochází ke genové konverzi, či zda je preimunní repertoár tvořen pouze přeskupením genů. Butler a Sun (1996) zjistili, že většina transkriptů genů pro těžké řetězce Ig prasat je odvozena pouze z pěti V_H genů, přičemž nečastěji jsou používány segmenty V_{HA} a V_{HB} . Při známé skutečnosti, že

v prasečím genomu je pouze jediný funkční J_H gen, docházíme ke značně omezenému genovému repertoáru. Podle některých nepřímých důkazů se zdá, že ke zvýšení variability idiotypů dochází mechanismem genové koverze (Butler et al., 1996; Sun and Butler, 1996; Sinkora et al., 2003).

3.6. PES JAKO IMUNOLOGICKÝ MODEL

Stejně jako prasata jsou psi velmi důležitým veterinárním modelem. Zároveň mají své nezastupitelné místo při studiu srovnávací imunologie. Jako u mnoha ne příliš prozkoumaných veterinárních druhů, je i u psů známo velmi málo o hematopoéze a vývoji imunity zvláště. I zde narážíme především na problém nedostatku druhově specifických monoklonálních protilátek. Na druhou stranu je známo mnoho protilátek vykazujících mezidruhovou křížovou reaktivitu. Navíc spektrum dostupných specifických protilátek proti prasečím a psím povrchovým lymfocytárním antigenům se do značné míry překrývá a doplňuje. Práce na psím modelu pomáhá rozšiřovat úvahy o prasečí B-lymfopoéze z hlediska srovnávací imunologie tam, kde nebylo možno použít specifické prasečí reagentie. Zvláštní důležitost má v tomto případě specifická monoklonální protilátka proti psímu CD34 (McSweeney et al., 1998). CD34 je důležitým markerem kmenových buněk a u prasat se jí dosud nepodařilo identifikovat. S pomocí této protilátky lze izolovat buňky kostní dřeně, které dokáží rekonstituovat hematopoézu u letálně ozářených zvířat. (Bruno et al., 1999). Další charakterizace těchto buněk ukázala, že psí mononukleární buňky kostní dřeně jsou – jako u ostatních druhů - $CD34^+c-kit^+$ a $CD34^+Flt-3-lig^+$ (Niemeyer et al., 2001). Při tomto přístupu ovšem nelze oddělit programované prekurzory jednotlivých hematopoetických řad, takže lymfoidní frakce bývá často kontaminována prekurzory červené krevní řady.

Na rozdíl od dosud studovaných druhů, není dosud jasné, zda prekurzory hematopoézy psů jsou MHC II pozitivní. Zatímco Neuner et al. (1997) je přesvědčen, že ve všech stádiích psí lymfopoézy lze nalézt jisté množství MHC II, Prendergast et al. (1986) tvrdí, že HSC jsou MHC II negativní. Tento rozpor se zřejmě odvíjí od techniky použité pro vizualizaci buněk (Yamaguchi et al., 1999).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA

Při experimentech byla použita outbreední miniaturní prasata odchovaná pro účely laboratoře imunologie a gnotobiologie MBÚ AV ČR v Novém Hrádku.

Konvenční miniprasata byla odchována metodou časného odstavu selat. Od prvního dne života jim byla podávána voda a jako příkrm komerční směs ČOS I *ad libitum*.

Bezmikrobní (GF) selata byla získána metodou otevřené hysterektomie prasnice ve 110. dni gestace (Miniats and Jol, 1973). Po předoperační přípravě gravidní prasnice byla provedena anestézie směsí halotanu, rajského plynu a kyslíku. Narkóza byla po dobu zákroku udržována v rozmezí 1.5 – 3.5% (Trávníček et al., 1966). Prasnice byla fixována na operačním stole ve hřbetní poloze, operační pole bylo dezinfikováno a zakryto rouškami. Skalpelem byla otevřena břišní dutina. Následně byla z těla prasnice vyjmuta děloha, která byla podvázána a následně extirpována v oblasti děložního krčku. Takto uvolněná děloha byla přemístěna prokladačem do sterilního boxu. Tam byla selata z dělohy vyjmuta, osušena a zbavena zbytků plodových obalů. Masáží hrudního koše pak byla provedena resuscitace. Po tomto ošetření byla selata přenesena do izolátoru, kde jim byly podvázány pupečníky, odstraněny špičáky a provedeno značení vrubováním. Selata byla odchována na mléčné dietě, přičemž doplňkové vitamíny a minerály byly podávány injekčně, stejně jako železo ve formě ferridextranu (Trávníček et al., 1966). Bezmikrobní stav izolátorů byl kontrolován podle metodiky vypracované Dlabačem (1980).

Asociace selat s definovanou mikroflórou byla prováděna *per os* v mléce a to v množství 1×10^8 – 5×10^8 živých bakterií. Osazení selat bylo kontrolováno mikrobiologickým rozborem obsahu fekálií.

Embrya a féty byly získávány z březích prasnic v různém období gestace. Prasnici, která byla pod celkovou anestézií, byla vyjmuta děloha a z ní byla potom vybírána jednotlivá embrya. Starší plody byly před vyjmutím vykrveny z pupečnickové žíly.

Ve všech případech byly prasnice po vyjmutí dělohy, stále pod vlivem anestézie, utraceny proříznutím krční tepny.

Psí kostní dřev byla získána z celkem osmnácti štěňat různého stáří různých plemen (novorozenci, 1 týden, 2 týdny a 1 měsíc) a tří dospělých psů plemene Beagel. Štěňata pocházela ze soukromých chovů. Psi plemene Beagel pocházely z chovu Výzkumného ústavu

veterinárního lékařství v Brně. Všechna zvířata byla vykrvena kardiální punkcí v celkové anestézii.

4.2. PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH SUSPENZÍ

Pupečnicková a periferní krev fětů a selat byla odebírána do heparinu. Erytrocyty byly z krve odstraňovány metodou hypotonického šoku nebo za použití komerčního kitu Easy Lyse (Dako Cytomation, S 2364). Při aplikaci metody hypotonického šoku bylo vždy k 1 ml plné krve přidáno 25 ml sterilní deionizované vody po dobu 30 sekund. Ihned poté byla obnovena osmotická rovnováha přidáním 25 ml 2x koncentrovaného PBS. Při práci s kitem Easy Lyse bylo postupováno dle doporučení výrobce. Populaci mononukleárních buněk z krve nebo kostní dřeně byla získávána na Ficollovém gradinetu dle doporučení výrobce (Histopaque 1077-1, Sigma).

Buněčné suspenze z tkání a orgánů byly získávány převážně mechanickým rozvolněním orgánů a filtrací přes nylon (Nyblot). Buňky kostní dřeně byly získány výplachem stehenních a holenních kostí roztokem PBS nebo –odběry pro *in vitro* kultivace –sterilním roztokem RPMI media.

Při značení pro průtokovou cytometrii byly získané suspenze několikrát promyty WSB (PBS; 0,2% želatina, Sigma G-7765; 0,1% azid sodný, Sigma S-2002). Po posledním promytí byly buňky resuspendovány v WSB v hustotě 5×10^6 – 1×10^7 .

Pro kultivace a buněčný sorting byly suspenze připravovány sterilně promýváním v roztoku RPMI media (RPMI 1640; 10% FCS; 100mM Sodium Pyruvate; 50 μ M β -mercaptoethanol; 200mM glutamine; vše Sigma).

4.3. ZNAČENÍ BUNĚK PRO PRŮTOKOVOU CYTOMETRII

4.3.1. POUŽITÉ PROTILÁTKY

Seznam použitých primárních protilátek je uveden v tabuce 1 (anti-prasečí) a tabulce 2 (anti-psi). Většinou se jednalo o protilátky neznačené fluorochromy. Pokud se jednalo o přímý konjugát s fluorochromem, je to v tabulce vyznačeno ve sloupci „Poznámky“.

V případech, kde byly použity sekundární protilátky, se vždy jednalo o kozi monoklonální protilátky proti izotypům myších imunoglobulinů. Tyto protilátky jsou konjugovány s FITC a RPE. Na trh jsou dodávány společností Southern Biotech, USA.

Název	Specifita	Izotyp	Reference	Poznámky
MSA4	CD2	IgG2a	Jonjic and Koszinowski, 1984	
8E6	CD3	IgG1	Komerční VMRD 0797-0201, USA	
K252.1E4	CD45	IgG1	Haverson et al., 1994	
MIL13	CD45RA		Zuckermann et al., 2001	
MIL5	CD45RC		Zuckermann et al., 2001	
HM57	CD79 α		Komerční – Dako Cytomation	Konjugována s APC, anti-lidská, široce křížově reagující
74-22-15	SWC3	IgG2a	Haverson et al., 1994	
27.2.1.	kappa	IgG1	Sinkora et al., 2001	
27.7.1.	lambda	IgG1	Sinkora et al., 2001	
LIG4	IgM	IgG1	Dvorak et al., 1986	Používána purifikovaná nebo jako FITC konjugát.
MSA3	SLA-DR	IgG2a	Jonjic a Koszinowski, 1984	

Tab. 3. Myší anti-prasečí monoklonální protilátky použité v této práci.

Název	Specifita	Izotyp	Zdroj	Poznámky
CA17.2A12	CD3	IgG1	P.F.Moore	School of Veterinary Medicine, Univ. Of California, Davis, CA
CA13.1E4	CD4	IgG1	P.F.Moore	
CA9.JD3	CD8	IgG2a	P.F.Moore	
CA2.1D6	CD21	IgG1	P.F.Moore	
CA20.8H1	TCR $\gamma\delta$	IgG2a	P.F.Moore	
CA12.10C12	CD45	IgG1	P.F.Moore	
CA4.1D3	CD45RA	IgG1	P.F.Moore	
CA1.4G8	Thy-1	IgG1	P.F.Moore	
CA2.1C12	MHC II	IgG1	P.F.Moore	
1H6	CD34	IgG1	BD Pharmingen	
CM7	IgM	IgG1	Serotec Ltd.	
HM57	CD79 α	IgG1	Dako Cytomation	RPE konjugát. anti-lidská. široce křížově reagující
DH59B	SWC3	IgG1	VMRD, Inc.	

Tab. 4. Myší anti-psí monoklonální protilátky použité v této práci

4.3.2. POVRCHOVÉ ZNAČENÍ BUNĚK PRO PRŮTOKOVOU CYTOMETRII

4.3.2.1. PŘÍMÉ ZNAČENÍ

Buněčné suspenze ve 100 μ l WSB byla inkubována s příslušnou protilátkou konjugovanou s flurochromem. Inkubace byla prováděna 30 minut při 4°C. Před měřením na průtokovém cytometru byla suspenze dvakrát promyta WSB při 1600 ot./min., 5 min.

4.3.2.2. DVOJÍ NEPŘÍMÉ ZNAČENÍ

K buněčné suspenzi ve 100 μ l WSB byly přidány příslušné primární protilátky dvou různých izotypů. Inkubace trvala 60 min při 4°C. Poté byla buněčná suspenze 2x promyta PBS s 10% normálním prasečím sérem (NPS). Sekundární protilátky byly naředěny WSB v poměru 1: 200 a v příslušné kombinaci přidány k buněčné suspenzi. Inkubace probíhala 45

min při pokojové teplotě na tmavém místě. Před měřením na průtokovém cytometru byla suspenze dvakrát promyta WSB při 1600 ot./min., 5 min.

4.3.3. INTRACELULÁRNÍ ZNAČENÍ

Pro intracelulární značení byla používána souprava IntraStain od firmy Dako Cytomation. Při značení buněk bylo postupováno podle návodu výrobce. Buněčná suspenze (50 μ l – 10^6 buněk) byla nejprve fixována roztokem A. Po 15 minutové inkubaci při pokojové teplotě byla suspenze promyta 2x PBS. Konjugovaná protilátka proti intracelulárnímu antigenu byla naředěna do permeabilizačního roztoku B, přidána k buněčné suspenzi a směs byla inkubována 15 min. při pokojové teplotě na tmavém místě. Před měřením na průtokovém cytometru byla suspenze dvakrát promyta WSB při 1600 ot./min., 5 min.

V případě že bylo prováděno zároveň značení proti povrchovému antigenu, byly buňky napřed označeny jako v bodě 4.3.2.2. a teprve potom byla provedena fixace buněk a poté intracelulární značení.

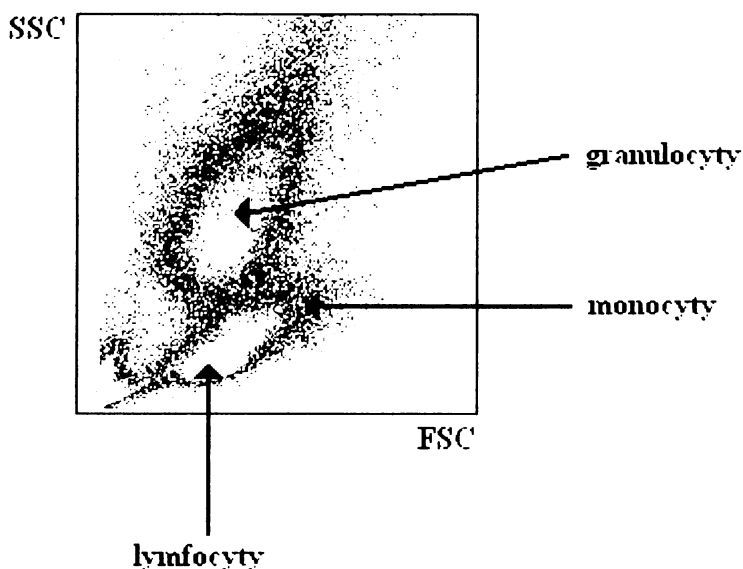
4.3.4. MĚŘENÍ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU

Buňky označené konjugáty příslušných protilátek byly měřeny na průtokovém cytometru FACS Sort od firmy Becton Dickinson. Měření bylo prováděno co nejdříve po značení buněk, nejpozději do 24 hodin, během kterých byla buněčná suspenze držena ve 4°C. Bezprostředně před měřením byl k buněčným suspenzím přidáván propidium jodid v koncentraci 1 μ g/ml, aby bylo možno při analýzách identifikovat mrtvé buňky. Toto značení nelze používat u buněk fixovaných pro intracelulární značení. Pro nastavení elektronické kompenzace přístroje byly před měřením používány kontrolní vzorky, označené vždy jen jedním fluorochromem (FITC, RPE nebo APC). Nespecifické vazby byly eliminovány pomocí systému vzorků značených pouze sekundárními reagensy a irelevantními izotypově specifickými sekundárními protilátkami. Akvizice byla nastavena v rozsahu 100 – 200 tisíc buněk. Data byla ukládána v elektronické podobě pro další zpracování.

Analýzy byly prováděny nejprve pomocí programu PC-LYSYS (verze 1.0, Becton Dickinson) a později pomocí programu Summit Software (verze 3.3, Dako Cytomation). K určení viabilních lymfocytů resp. monocytů byl použit systém elektronického ohraničování (gate). Do analýz byly zahrnovány pouze buňky živé (nefloreskující na FL3 – propidium

jodid). Podle charakteristik velikosti a granularity (FSC/SSC) byly pak rozlišeny lymfocyty od ostatních buněčných populací a mononukleární buňky od granulocytů (Obr. 3.)

Analýza povrchové exprese byla následně prováděna kvadrantovou nebo regionální analýzou.



Obr.3. Rozložení jednotlivých populací prasečích leukocytů na akvizičním grafu podle velikosti a granularity buněk.

4.4. TŘÍDĚNÍ BUNĚK

4.4.1. TŘÍDĚNÍ BUNĚK POMOCÍ MAGNETU (MAGNETICKÝ SORTING)

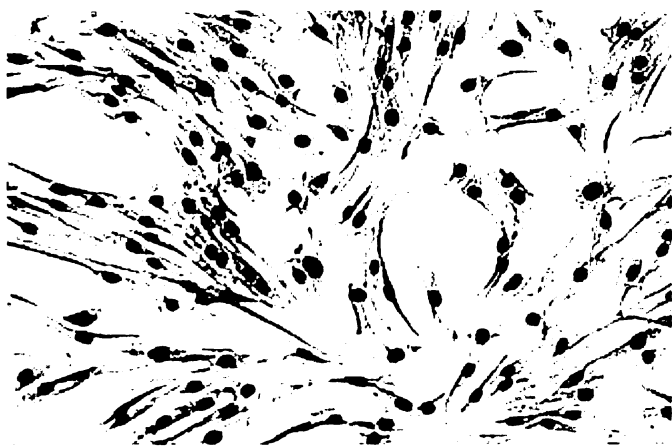
K hrubší separaci buněk pozitivních pro některé povrchové znaky byl použit systém mini MACS (Miltényi Biotech). Buněčná suspenze byla označena primární myší anti-prasečí protilátkou a inkubována s magnetickými kuličkami (Miltényi Biotech), na nichž je navázána protilátka proti myšimu IgG. Po 20 minutové inkubaci a promytí v mediu RPMI byly buňky tříděny na paramagnetické koloně v magnetickém poli podle návodu výrobce. Čistota separované populace byla ověřována pomocí průtokového cytometru.

4.4.2. TŘÍDĚNÍ BUNĚK NA PŘÍSTROJI FACS VENTAGE

Buněčné suspenze pro třídění na přístroji FACS Ventage (Becton Dickinson) byly připravovány sterilně v RPMI medu, obohaceném 20% FCS. Buňky byly dvojitě označeny primárními a následně sekundárními protilátkami tak, jak je popsáno výše s tím rozdílem, že objem buněčných suspenzí se pohyboval mezi 1-3 ml, při zachování hustoty buněk kolem 10^6 /ml. Těsně před separací byl přidán propidium jodid. Zkumavka s buněčnou suspenzí byla vložena do přístroje a byly nastaveny parametry pro akvizici a třídění. Podle potřeb byla tříděna jedna nebo dvě populace v různém množství. Třídění probíhalo buď do FCS (pro další kultivaci vytríděných buněk) nebo do roztoku proteinázy K (pro potřeby molekulární biologie). Čistota vytríděných buněk byla kontrolována zpětnou akvizicí a reanalýzou obdržených populací.

4.5. PŘÍPRAVA PODPŮRNÝCH BUNĚK THYMOVÉHO STROMATU

Pro pěstování prasečích buněk kostní dřeně *in vitro* byly používány podpůrné buňky (feeder layer). Tyto buňky byly generovány ze stromálních buněk thymu. Ve sterilních podmínkách byly odebrány thymy prasečích fétů (DG 90). Tkáň byla mechanicky desintegrována pinzetami. Z kultivační misky byly odebrány větší kusy tkáně, menší kusy byly ponechány v kultuře. Po 8-12 hodinách kultivace bylo vyměněno medium tak, aby nedošlo k poškození již přisedlých buněk, ale aby zároveň byly odstraněny všechny větší kusy tkáně, které by mohly nekrotizovat. Nakonec bylo přidáno čerstvé medium. V případě potřeby byly buňky pasážovány pomocí roztoku Trypsinu (Sigma).



*Obr. 4 In vitro kultura buněk
prosečího thymového
stromatu. Primární kultura po
třech týdnech kultivace,
barvení May-Grünwald a
Giemsa-Romanowski, zvětšení
40x.*

4.6. KULTIVACE BUNĚK

Kultivace prasečích buněk kostní dřeně byla prováděna v mediu RPMI 1640, obohaceném 10% fetálního telecího séra (FCS), 200 mM glutaminu, 50 μ M β -merkaptoethanolu, 100 mM pyruvátu sodného (vše Sigma) a směsí antibiotik (Sigma, P0781), dávkování dle doporučení výrobce. Kultivace byla prováděna za standardních podmínek v 5% atmosféře CO₂ při 37°C.

4.7. PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ HYBRIDOMŮ

Ve snaze získat nové klony protilátek proti prasečím lymfocytům a zejména jejich prekurzorům byly prováděny imunizace a následné fúze buněk za účelem získání hybridomů. Tato technika je detailně popsána v mé diplomové práci (Morávková, 2001, str. 37-48) a tento pracovní postup byl –až na drobné modifikace- dodržován i v této práci. Celkem byly pro imunizace použity čtyři skupiny myši. V Novém Hrádku byly myši imunizovány mononukleárními buňkami izolovanými pomocí Ficollého gradientu (Histopaque 1077-1, Sigma) z kostní dřeně prasečích fétů (okolo DG 90). Z gradientu byla odebrána frakce odpovídající mononukleárním buňkám. Buněčná suspenze byla třikrát promyta roztokem PBS. Zvířatům bylo aplikováno 10⁶ buněk intraperitoneálně a intrasplenicky podle protokolu uvedeného v Morávková, 2001. Na University of Iowa byly k imunizacím použity rekombinantní proteiny V-preB, CD34 a CD19, izolované z buněk *E. coli*, zaklonované do rekombinantních vektorů pBlueScript nebo pET26b.

K testování produkce protilátek jednotlivými hybridními klony byla použita průtoková cytometrie. Buněčné suspenze získané z kostních dření prasečích fétů byly nejprve inkubovány s hybridomovým supernatantem jako primární protilátkou s návazným blokačním krokem jako v 4.3.2.2. Jako sekundární protilátka byla použita prasečí anti-myší polyklonální protilátka, značná FITC (SwAM FITC, Sevac). Výsledky byly odečítány na průtokovém cytometru. Izotypy protilátek byly testovány použitím SBA Clonotyping System/HRP (Southern Biotech) podle návodu výrobce.

Na University of Iowa předcházela tomuto kroku selekce klonů pomocí ELISA a WesternBlott metod, kdy byly jednotlivé klony testovány na reaktivitu s izolovaným rekombinantním proteinem. Vybrané klony, které se při těchto testech jevíly pozitivní, byly

následně testovány na buněčných suspenzích, získaných z periferní krve a kostní dřeně jatečných zvířat, průtokovou cytometrií.

4.8. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla použita k namnožení žádaných úseků lymfocytární DNA, zejména variabilních sekvencí genů pro Ig. Jako templát tedy sloužila DNA izolovaná z prasečích lymfocytů. Jako primery byly použity oligonukleotidy nazvané α -JH (TGAGGACACGACGACTTCAA), FR1-3' (CTCCTGTGTCGGCTCTGGA) a FR1-5' (GAGGAGAAGCTGGTGGAGT), které odpovídají krajním úsekům hypervariabilní sekvence CDR3 na genu prasečího Ig. Pro PCR byla v Novém Hrádku používána souprava dodávaná firmou Top-Bio s enzymem Taq-Purple DNA polymeraza (PPP Master Mix). Na University of Iowa byly používány Klen-Taq polymeráza s příslušným pufrem (Qiagen) a směs jednotlivých dNTP (Qiagen).

Cyklus pro množení DNA: A) 94°C, 2 min; B) 94°C, 30 s; 58°C, 30s; 72°C, 30s; C) 72°C, 5min.

Pro namnožení dostatečného množství DNA byl část B) cyklu opakována 30x.

5. VÝSLEDKY

5.1. PRASEČÍ MODEL

5.1.2. Molekula CD19

5.1.2.1. SEKVENOVÁNÍ CD19 A URČENÍ MEZIDRUHOVÉ HOMOLOGIE

Na základě známých sekvencí genu pro CD19 u jiných savčích druhů byla vytvořena pětice degenerovaných primerů. Při použití páru E (senseE: 5'-ctatgagaacgactccaa-3'/antisenseE: 5'-atttcataagagtccgcatctt-3') jsme získali fragment, jehož totožnost byla potvrzena sekvenováním (Gene Bank: AF466765). Na základě tohoto fragmentu byly navrženy další primery tak, až bylo možno sestavit a sekvenovat celý produkt CD19 (Sun et al., 2004).

Následně byla stanovena sekvenční homologie mezi genem pro CD19 prasat a dalších druhů. Nejbližší prasečímu proteinu je protein lidský, s nímž sdílí více než 72% homologii. Poněkud vzdálenější je morče (70%) a nejvíce rozdílů najdeme u myši (pouze 68% homologie), přičemž u všech jmenovaných druhů je podstatně větší variabilita v extracelulární oblasti (homologická u lidí z 60%, u morčat s 50% a u myši z 60%), naopak intracelulární doména je podstatně víc konzervována v evoluci (85%, 82% a 76%).

Stejně jako lidská molekula CD19, i prasečí homolog má dvě extracelulární imunoglobulinové domény, které jsou stabilizovány za pomoci disulfidických můstků. Jsou zde také čtyři potenciální glykosylační místa, jejich umístění se ovšem od lidského protějšku liší. Stejně jako u CD19 jiných druhů, nachází se v cytoplazmatické doméně prasečí CD19 tyrozinový motiv (YEND/E), který se váže na SH2 doménu tyrozinokinázy Fyn. U prasat se tyto tyroziny nachází v pozicích 416 a 457.

Výše prezentované výsledky vznikly v laboratoři prof. Butlera – University of Iowa. Tuto část práce vykonala J. Sun.

5.1.2.2. PŘÍPRAVA MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK PROTI CD19

Molekula CD19 je z hlediska imunofenotypizace leukocytů považována za jeden z nejdůležitějších povrchových znaků specifických pro B linii krvetvorby. U prasat však nelze kritéria exprese tohoto antigenu na intaktních buňkách použít, protože dosud neexistují specifické monoklonální protilátky proti prasečímu CD19. Vzhledem k tomu, že gen pro prasečí CD19 byl sekvenován a existovala tedy možnost získat celý polypeptid nebo jeho významnou část pomocí genových manipulací, použili jsme techniku imunizace rekombinantním proteinem, respektive jeho částmi.

5.1.2.3. EXPRESE PRASEČÍHO CD19 V BAKTERIÍCH

Aby bylo možno získat polypeptid odpovídající prasečímu CD19 v laboratoři ve velkém množství, byly nejprve jeho fragmenty klonovány pomocí bakteriálního expresního systému. Vybrali jsme část extracelulární domény (Y86-L210, M.W. 21 kDa), která byla včleněna do expresního vektoru pET26b. Po transformaci kompetentních bakterií rekombinantním vektorem následované selekcí klonů a jejich pomnožením za podmínek zaručujících vysokou produkci rekombinantního polypeptidu jsme tento izolovali a ověřili jeho molekulovou hmotnost a čistotu pomocí SDS-PAGE. Protein separovaný z elektroforetických gelů byl také použit k imunizaci myší.

5.1.2.4. PŘÍPRAVA A ANALÝZA HYBRIDOMŮ

Standardní metodou buněčné fúze (viz. Morávková, 2001: str. 42-43) bylo připraveno několik stovek hybridomových buněk, které byly testovány na produkci protilátek a následně stabilizovány klonováním. Ze vzniklých hybridomových klonů bylo vybráno celkem 11 kolonií, jejichž supernatanty obsahovaly protilátky rozeznávající použitý CD19 fragment na Western blotu prasečích lymfocytů. Z těchto 11 klonů byly nakonec vybrány čtyři (G1-1, G1-2, D5 a G4-1), které vykazovaly nejvyšší reaktivitu s antigenem a zároveň největší a nejstabilnější produkci protilátek.

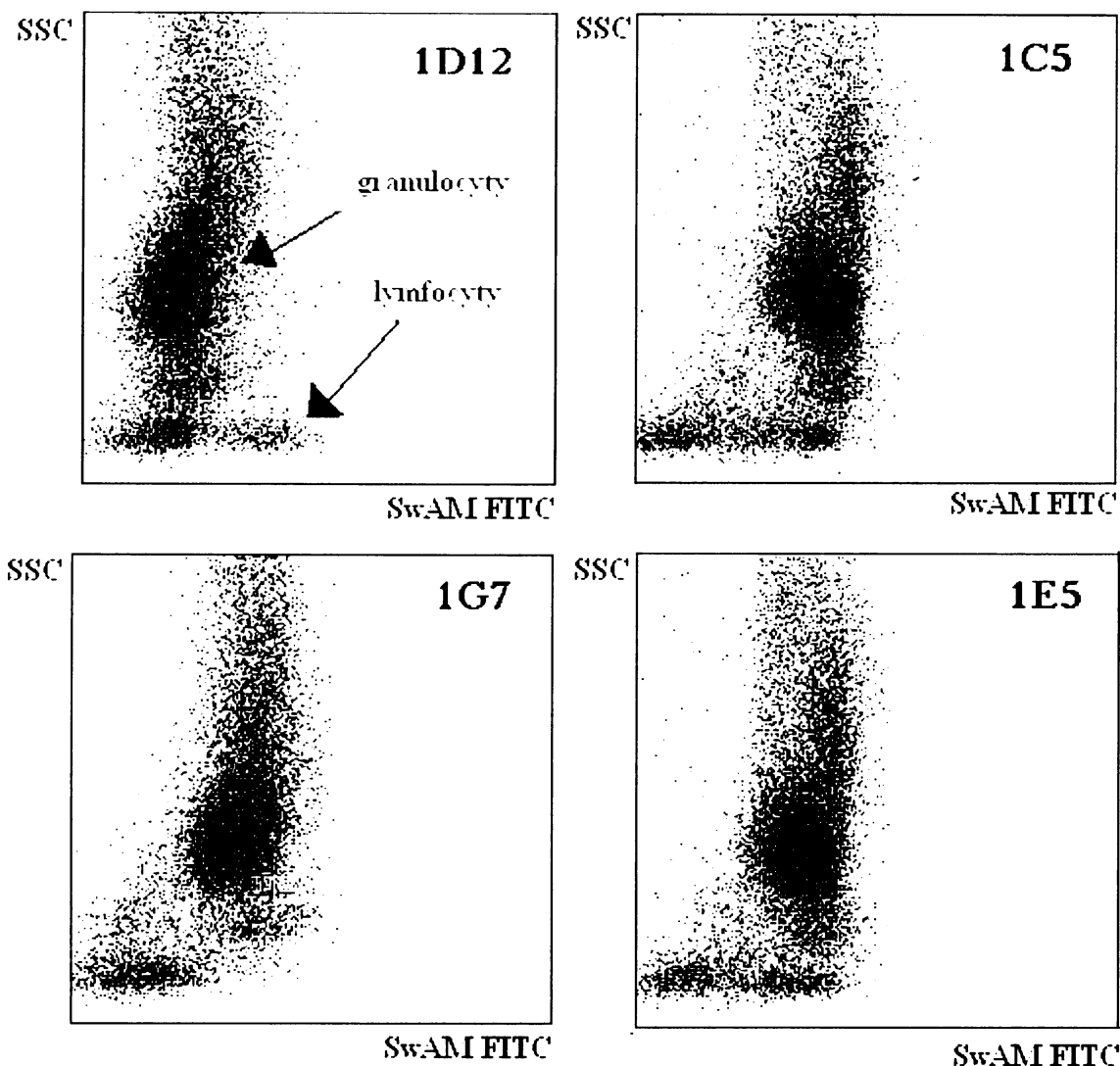
Tyto protilátky byly následně testovány přímo na prasečích buňkách, a to dvěma způsoby. Pro testy metodou Western blot byl jako antigen použit lyzát buněk prasečí B buněčné linie L23. Ačkoli pro všechny vybrané MoAb byl zachycen pozitivní signál, byl-li použit jako antigen rekombinantní protein, při použití lyzátu L23 buněk nebyl zaznamenán

žádný takový signál. Schopnost vybraných monoklonálních protilátek vázat nativní CD19 byla dále prověřována metodou nepřímé imunofluorescence a průtokové cytometrie prasečích leukocytů izolovaných výplachem kostní dřeně sterna jatečního prasete. Signál, který poskytovaly všechny čtyři vybrané MoAb při akvizici průtokovým cytometrem byl ovšem jen velmi slabý a nebylo prakticky možno jej rozlišit od pozadí. Tato měření jsou v souladu s výsledky obdrženyými předchozí metodou.

Vybrané klony jsou tedy schopny rozlišit fragmenty rekombinantního proteinu, nikoliv však nativní protein na povrchu prasečích leukocytů.

5.1.3. PŘÍPRAVA MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK PROTI DALŠÍM PVRCHOVÝM PROTEINŮM BUNĚK B LYMFOCYTÁRNÍ ŘADY

Protože spektrum dostupných protilátek proti prasečím B lymfocytům a zejména jejich prekurzorům je omezený, přistoupili jsme k vývoji nových hybridomových linií, které by vykazovaly žádanou specifitu. Jako antigen pro imunizaci byly použity mononukleární buňky prasečí fetální kostní dřeně (DG90; 10^6 buněk/imunizace; detailní popis použité metody viz. Moravkova, 2001; str. 38-47) Po třetí imunizaci byla testována séra použitých zvířat na přítomnost specifických protilátek proti povrchovým antigenům prasečích leukocytů. Imunní séra ředěná 1:10, 1:100 a 1:1000 byla inkubována s antigeny a vazba k povrchu buněk byla po promytí zviditelněna nepřímou imunofluorescencí pomocí sekundární protilátky SwAM-FITC. Zvíře s nejvyšším titrem specifických protilátek v séru bylo zvoleno jako dárcce slezinných buněk pro buněčnou fúzi. Jednotlivé hybridomy získané buněčnou fúzí byly testovány na produkci protilátek specifických proti buňkám prasečí fetální kostní dřeně nepřímou imunoflorescencí na průtokovém cytometru. Jako sekundární protilátka byla opět používána SwAM FITC. Více než polovina testovaných hybridomů jevila pozitivní reakci. Tato reakce ovšem nebyla nikdy omezena na jednotlivou populaci buněk a většinou zahrnovala jak mononukleární buňky, tak i granulocyty. Pro klonování a další testování byly vybrány čtyři hybridomy (1D12, 1C5, 1G7 a 1E5) (obr. 5.), u nichž se vyskytovala silnější reakce pro jednotlivé subpopulace buněk. Přes veškerou snahu se však snižovala stabilita získaných hybridomů a s tím produkce protilátek. Navíc se nám nepodařilo najít žádnou konkrétní monoklonální protilátku, která by vykazovala neobvyklou a pro nás zajímavou specifitu.



Obr. 5. Reakce hybridomových supernatantů s buňkami prasečí kostní dřeně

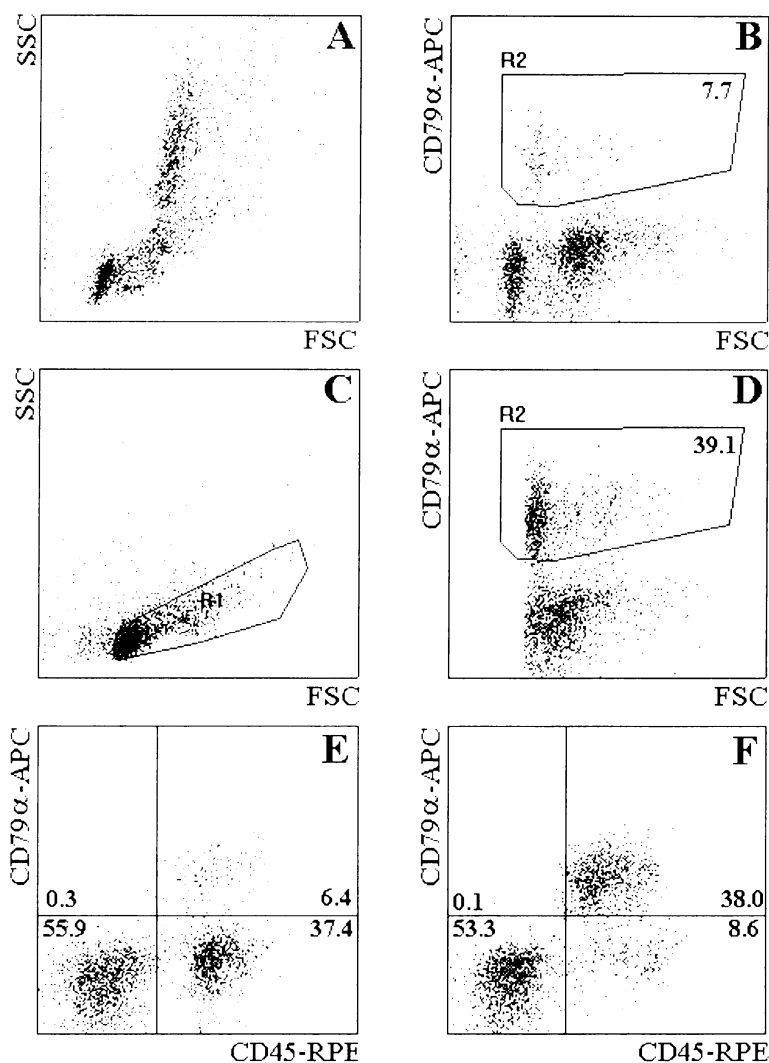
5.1.4. IDENTIFIKACE BUNĚK B LINIE VE FETÁLNÍ KOSTNÍ DŘENI POMOCÍ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY PROTI CD79 α .

Aby bylo možno spolehlivě identifikovat B buňky a zejména jejich prekurzory, potřebovali jsme liniový marker, který se vyskytuje na co nejvíce stádiích B lymfopoézy. Tomuto kritériu velice dobře odpovídají molekuly CD79 (viz. 3.3.2.4.3.). Protílátka namířených proti tomuto proteinu je k dispozici celá řada. Přestože křížová reaktivita MoAb HM57 s prasečí CD79 α byla popsána již v původní práci Mason et al. (1991) a její využití při diagnostice a klasifikaci lymfomů u veterinárních druhů je celkem běžné, nebyla podle dostupných literárních údajů tato reagentie nikdy použita k vizualizaci B buněk průtokovou cytometrií u jiných druhů než u člověka. Nejdříve jsme tedy testovali její využitelnost pro

detekci a kvantifikaci prasečích leukocytů průtokovým cytometrem na leukocytech periferní krve a buňkách kostní dřeně (obr. 6). Na obr. 6B je příklad přímé imunofluorescence fixovaných a permeabilizovaných buněk získaných výplachem prasečí fetální kostní dřeně 106. den gestace a označených konugátem HM57-APC. V uvedeném případě je přibližně 8% buněk jasně pozitivních (B) a jejich rozptylová charakteristika znázorněná v (C) dokazuje, že se jedná o mononukleární objekty s převahou malých buněk. V oblasti svého převážného výskytu (R1 v C) tvoří $CD79\alpha^+$ buňky 40 % (D) a povrchové nepřímé značení MoAb anti-CD45 následované intracelulárním značením HM57-APC dokazuje přítomnost pan-leukocytárního znaku CD45 na povrchu všech (E) i mononukleárních (F) $CD79\alpha^+$ buněk kostní dřeně prasat.

5.1.5. DISTRIBUCE B LYMOIDNÍCH BUNĚK VE FETÁLNÍ KOSTNÍ DŘENI

Podle dřívějších pozorování (Šinkora et al., 1998) všechny prenatální prasečí B buňky ($sIgM^-$ lymfocyty) nesou CD2 antigenu s povrchovou hustotou nižší než T a NK buňky. Zároveň byla v hematopoetických centrech nalezena populace buněk ($CD2^{lo} CD45^+ SLADR^+$), o nichž se předpokládalo, že patří k prekurzorům B řady, z nichž většina odpovídala velikostí pre-BII buňkám známým u jiných druhů. Abychom potvrdili tuto hypotézu, značili jsme mononukleární buňky fetální prasečí kostní dřeně různými kombinacemi specifických protilátek. Jako specifický znak B linie jsme v tomto případě použili těžký řetězec IgM (μ), který se na povrchu ($s\mu$) buněk B řady objevuje po úspěšném přeskupení genů kódujících variabilní doménu těžkého řetězce při přechodu ze stádia pro-B buněk do stádia pre-B buněk. Dvojí značení CD2/ $sIgM$ rozdělí mononukleární buňky do pěti populací (obr. 7B). Kromě dvojité negativních buněk ($CD2^-s\mu^-$) je možno v mononukleární frakci buněk odolných k hypotonickému šoku (hypotonic shock-resistant cells, HSRC) identifikovat další 4 populace, všechny $CD2^+$, které se liší velikostí a povrchovou hustotou řetězce μ . Zároveň všechny $sIgM^+$ buňky jsou CD2 pozitivní. Neexistence IgM^+CD2^- populace napovídá, že exprese CD2 na dřevných mononukleárních buňkách ontogeneticky předchází expresi IgM.



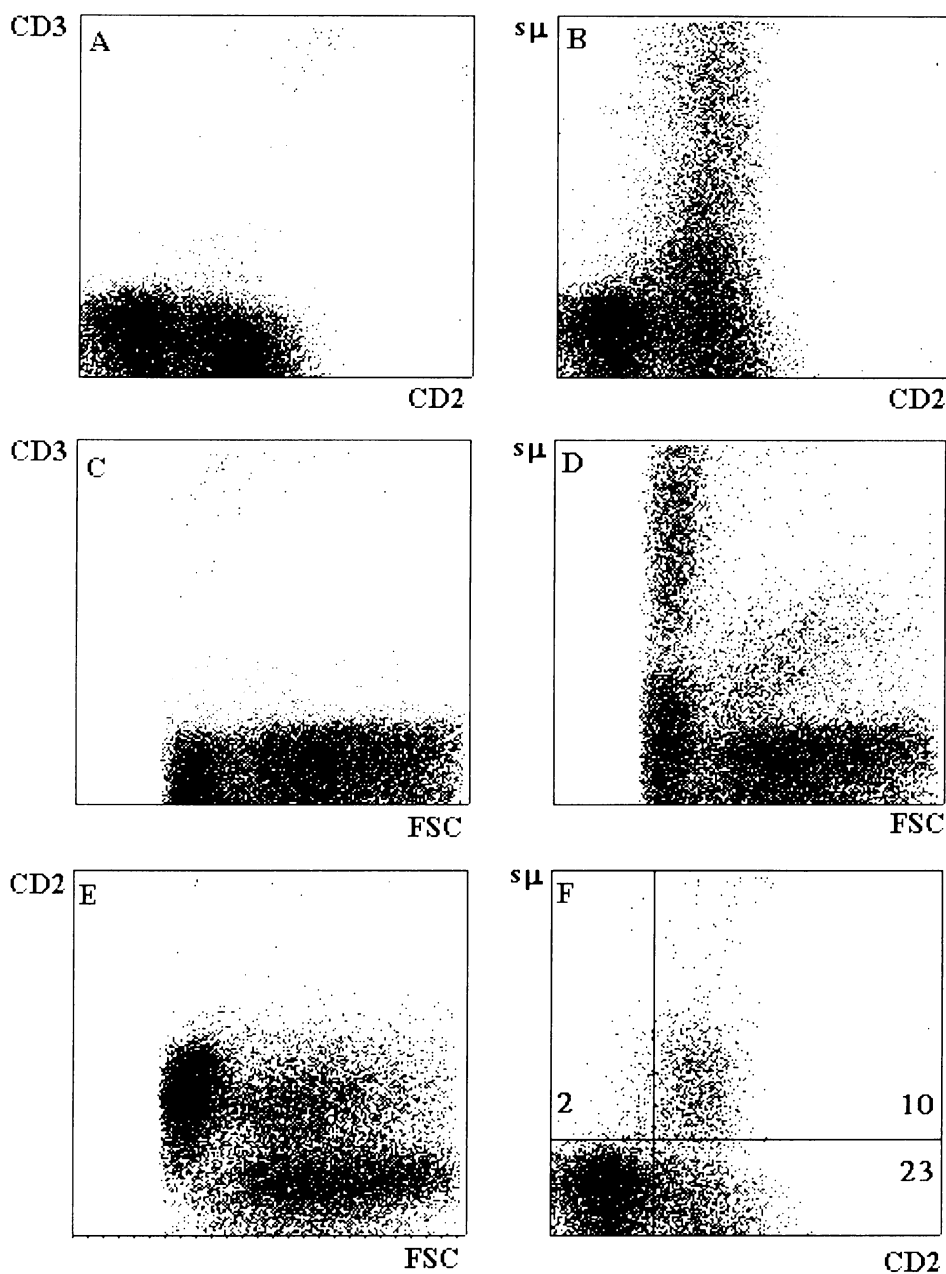
Obr. 6. Prutokově cytometrická analýza fetální kostní dřeně prasat (DG106). Značeno anti-CD79 α a anti-CD45 (A) Rozptylový diagram všech buněk kostní dřeně pomocí parametru FSC a SSC. (B) Buňky z obr. A v diagramu ukazujícím velikostní parametr (FSC) oproti APC fluorescenčně značené anti-CD79 α protilátce. Ze všech buněk kostní dřeně je do 10% malých buněk pozitivních pro CD79 α . (C) CD79 α ⁻ buňky tvoří kompaktní seskupení (region R1) v oblasti s nízkou (malé buňky) i vysokou (velké buňky) hodnotou parametru FSC a nízkou hodnotou SSC, přičemž malé buňky převažují. (D) Analýza buněk z regionu R1 (obr. C) v diagramu FSC/CD79 α APC. Přibližně 40% mononukleárních (R1) buněk kostní dřeně nese antigen CD79 α a patří tedy k B buněčné linii krvetvorby. (E) a (F): Profil koexprese CD45 versus CD79 α na všech (E) a mononukleárních (F) buňkách prasečí kostní dřeně ukazující, že všechny CD79 α ⁻ buňky jsou CD45⁻ leukocyty.

Značíme-li buňky pouze sIgM a následně je roztřídíme podle velikostního parametru FSC (obr. 7D), vidíme, že populace IgM pozitivních buněk je tvořena třemi subpopulacemi buněk různé velikosti. Velké (FSC^{hi}) a malé (FSC^{lo}) buňky s nízkou expresí μ jsme považovali za dvě po sobě následující stádia pre-B II buněk, tzv. velké a malé pre-B II buňky, malé buňky se střední až vysokou expresí μ pravděpodobně představují nezralé B lymfocyty, poslední diferenační stádium primární B lymfopoézy, ve kterém B buňky kostní dřevě opouštějí a putují do periférie, kde dozrávají. Jestliže podobné velikostní rozlišení použijeme i pro CD2⁺ populaci (obr. 7E), dostaneme podobný obrazec jako v případě (obr. 7B), s tím rozdílem, že exprese CD2 na malých buňkách je sice silnější, ale nikoli vyšší než u velkých mononukleárních buněk. Z toho vyplývá, že všechny malé mononukleární lymfocyty jsou CD2⁺sIgM⁺. Populaci velkých buněk naproti tomu bylo nutno podrobit ještě důkladnějšímu rozboru. Uděláme-li analýzu CD2/IgM velkých mononukleárních buněk (obr. 7F), vidíme, že se CD2 pozitivní populace opět rozpadá do dvou skupin, přičemž sIgM negativní buňky tvoří asi 2/3 této populace, zbývající třetinu tvoří CD2⁺ sIgM⁺ dvojitě pozitivní buňky. Z toho lze uzavřít, že během vyžívání mononukleárních lymfocytů B linie dochází nejprve k expresi CD2 (stádium pre-B I). Po přeskupení genů těžkých řetěců Ig dochází k expresi sIgM (jako součásti preBCR) a přechodu buněk do stadia velkých pre-B II (FSC^{hi} CD2⁺ sIgM^{lo}). Následně dochází k přeskupení genů pro lehké řetězce imunoglobulinů a jejich expresi v maturovaném komplexu BCR (malé pre-B II). Buňky vyžívají, zmenšují se a zároveň zvyšují koncentraci BCR na svém povrchu až se ve stadiu FSC^{lo}IgM^{hi} stávají nezralými B buňkami a opouští kostní dřevě. Exprese CD2 se v tomto stadiu nemění.

Analýza povrchové exprese μ a CD2 na mononukleárních HSRC kostní dřevě prasat nám tedy umožnila navrhnout hypotetickou diferenační řadu B lymfopoézy prasat podle následující tabulky:

diferenační stádium	pro-B / pre-B I	velké pre-B II	malé pre-BII	nezralé B
μ	-	low	low	medium/ high
CD2	+	+	+	+
FSC	high	high	low	

Tab. 5. Povrchová exprese μ a CD2 na prekurzorech B lymfocytu



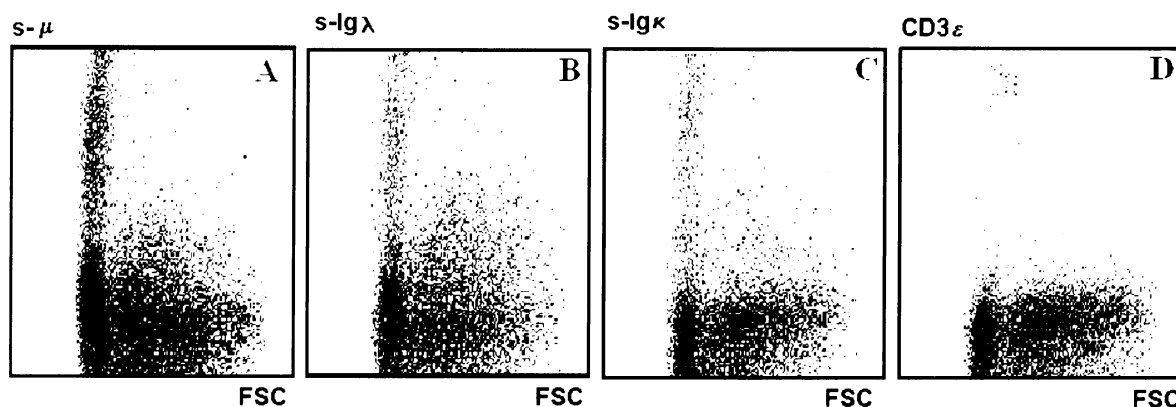
Obr. 7. Obr. xxx. Expresse CD3, $s\mu$ a CD2 na HSRC prasečí fetální kostní dřeň (DG95) měřená nepřímou imunofluorescencí. Vazba anti-CD3 a anti-IgM (obě myší IgG1) byla zviditelněna goat anti-mouse IgG1-RPE, značení anti-CD2 (myší IgG2a) bylo zviditelněno goat anti-mouse IgG2a-FITC antisérem. Mononukleární frakce HSRC kostní dřeň fétu na konci gestace obsahuje pouze ojedinělé $CD3^+$ T buňky, což odráží minimální kontaminaci vzorku dřeň periferní krví (A). Zároveň je zřejmá nepřítomnost CD3 na většinové populaci $CD2^{lo}$ buněk a anti-CD3 protilátka slouží jako izotypová kontrola pro značení anti-IgM (B). Vazba anti-IgM k $CD2^{lo}$ populaci dřeňových buněk má poměrně heterogenní profil s většinou populací vykazující nulovou nebo nízkou povrchovou expresi μ (B). Analýza velikosti (FSC) mononukleárních HSRC pozitivních pro CD3 (C) a $s\mu$ (D)

umožňuje odlišit velké buňky s nízkou expresí μ od velmi malých buněk s velmi nízkou ale jasně prokazatelnou expresí μ . Zvyšování exprese μ je doprovázeno mírným nárůstem hodnoty FSC (velkosti) buněk. Všechny malé a významná část velkých mononukleárních HSRC kostní dřeně nesou na povrchu CD2 (E). Analýza koexprese μ a CD2 na povrchu velkých HSRC ukazuje přítomnost dvou CD2+ populací, které se liší přítomností μ na povrchu.

5.1.6. CHARAKTERIZACE PREKURZORŮ B BUNĚK V MONONUKLEÁRNÍ FRAKCI LEUKOCYTŮ PRASEČÍ KOSTNÍ DŘENĚ POMOCÍ POVRCHOVÉ EXPRESE IMUNOGLOBULINŮ

Klasifikace monoklonálních protilátek namířených proti lehkým řetězcům prasečích imunoglobulinů (Ig κ a Ig λ , odkaz na naši práci) nám umožnila porovnat vazbu anti-Ig κ (klon 27.2.1.) a anti-Ig λ (klony 27.7.1, 1G6 a K139.3E1) k povrchu HSRC izolovaných z kostní dřeně prasečích fětů ve třetím trimestru gestace. Podobně jako v případě anti-IgM jsme ke zviditelnění vazby primárních protilátek použili kozí antiséra značená RPE a specifická pro podtřídy myších Ig. Obr. 8 ukazuje porovnání typických profilů imunofluorescence mononukleárních HSRC kostní dřeně prasečích fětů značených anti-IgM (A), anti-Ig λ (B), anti-Ig κ (C) a anti-CD3 (D). Zatímco procentuální zastoupení velkých HSRC značených anti-IgM and anti-Ig λ je u všech studovaných vzorků stejné (srovnej Obr. 8 A a B), je vazba anti-Ig κ i anti-CD3 k velkým mononukleárním buňkám kostní dřeně sporadická (srovnej buňky s vysokou hodnotou FSC v Obr. 8 C a D). Podobně naprostá většina malých HSRC reaguje s anti-IgM and anti-Ig λ s velmi nízkou až velmi vysokou intenzitou (Obr. 8 A a B), zatímco většina malých HSRC zůstává Ig κ ⁻ a lze zaznamenat pouze přítomnost buněk se střední a vysokou expresí Ig κ na povrchu (Obr. 8 C). Takovéto expresní profily těžkého a lehkých řetězců Ig lze snadno interpretovat v souladu s klasifikací B buněčných prekurzorů definovaných v tabulce 1 a na základ faktů, že mnohé monoklonální protilátky specifické pro Ig λ jiných druhů reagují s λ -podobnou (λ 5) částí náhradního lehkého řetězce asociovaného na povrchu pre-B buněk s těžkým řetězcem Ig typu μ (s μ , Rolink, ústní sdělení). Velké (FSC^{hi}) i malé pre-B II buňky definované jako μ ^{lo} (Fig. 8 A) budou tedy mít rovněž Ig λ ⁻ povrchový fenotyp, zatímco Ig κ řetězec na jejich povrchu bude chybět. Přejít do stádia nezralých B buněk doprovázený přeskupením genů pro lehké řetězce a následnou povrchovou expresí Ig κ nebo Ig λ je zřetelný díky existenci populací sIg κ ^{+/+++} a sIg λ ^{+/+++}, jejichž velikost se v součtu rovná u všech měřených vzorků velikosti populace malých sIgM^{+/+++} HSRC. Vzájemná

exkluzivita exprese Ig κ a Ig λ byla potvrzena dvojitým nepřímým značením pomocí MoAb 27.2.1 (anti-Ig κ , myší IgG1) a K139.3E1 (anti-Ig λ , myší IgG1).

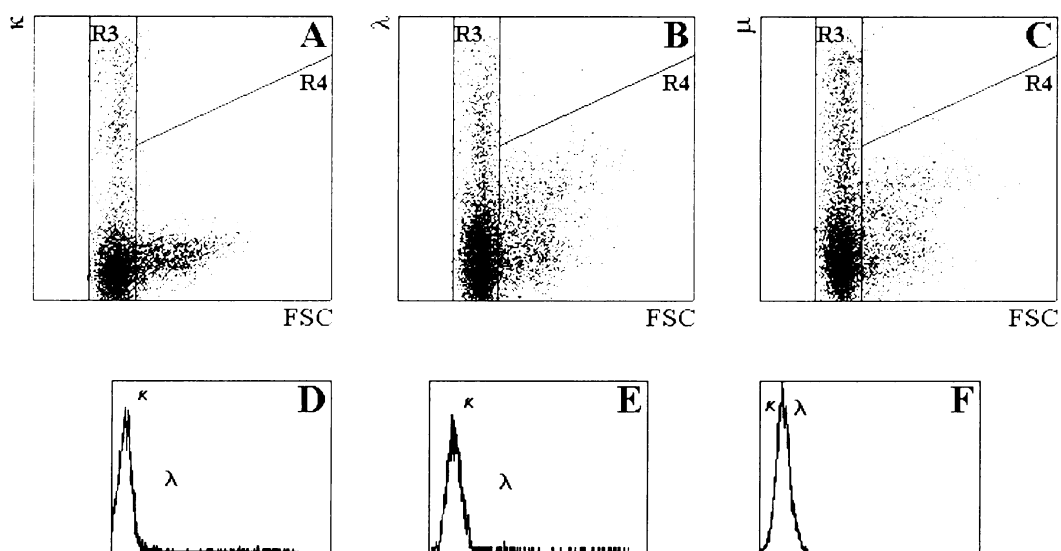


Obr. 8. Exprese těžkého řetězce imunoglobulinu (A), lehkého řetězce lambda (B) a lehkého řetězce kappa (C) na mononukleárních buňkách kostní dřeně v závislosti na jejich velikosti. (D) Kontrola – buňky kostní dřeně jsou značeny protilátkou proti CD3.

Zobrazíme-li velikost (FSC) mononukleárních buněk kostní dřeně proti míře exprese sIgM v hustotním diagramu, jednoznačně vidíme rozdělení sIgM pozitivních buněk na tři populace. Na hustotním diagramu se zřetelně vyděluje populace sIgM^{hi} buněk, kterých je ve fetální kostní dřeni kolem 10%. Oproti tomu je přechod mezi FSC^{lo} a FSC^{hi} méně zřetelný a lze prakticky říci, že frakce obsahuje buňky všech možných velikostí a rozložení IgM^{lo} buněk je z hlediska FSC parametru rovnoměrné. Počítáme-li všechny mononukleární buňky kostní dřeně, sIgM exprimuje 62% z nich. Procento buněk náležejících k B buněčné linii je však ještě vyšší, protože IgM není exprimováno v pro-B buňkách.

Analýza HSRC je především výhodná z hlediska velmi významného (>99 %) obohacení suspenze buněk kostní dřeně o leukocyty během lyzačního kroku (Šinkora J. et al. 1998). Standardně užívané techniky lýzy erytrocytů pomocí síranu amonného vedou k pouze částečnému odstranění buněk červené řady a oblast velmi malých leukocytů, ve které lze pomocí rozptylu excitačního paprsku v průtokovém cytometru nalézt dominantní populaci primární B krvetvorby, tedy pre-B II buňky, je kontaminována četnými prekurzory červených krvinek, což činí analýzu exprese povrchových znaků na pre-B II buňkách velmi komplikovanou. Kombinace značení pan-leukocytárního antigenu CD45 a povrchových Ig při nepřímé dvojitě imunofluorescenci bylo po dlouhou dobu v naší laboratoři neproveditelné protože všechny relevantní myší MoAb byly třídy IgG1. Na druhou stranu je hypotonický šok poměrně málo šetrná izolační technika, při které dochází k významným ztrátám leukocytů a navíc nelze vyloučit změnu exprese povrchových znaků leukocytů způsobenou jejich

vystavením prakticky nulovému osmotickému tlaku. Proto jsme ve druhé části naší práce využili dostupnost fluorochromem značené monoklonální protilátky HM57 namířené proti intracelulární části lidského CD79 α (Jones et al., 1991) o které bylo známo, že reaguje s B lymfocyty různých druhů včetně prasat (Jones et al., a další reference) a kombinovali jsme povrchovou imunofenotypizaci s detekcí exprese tohoto pan-B antigenu. Nejprve jsme na buňkách periferní krve potvrdili použitelnost HM57-RPE a HM57-APC pro uvedenou techniku značení a také specifitu vazby těchto konjugátů k B-linii lymfopoezy (reference od Martina Faldyny, přijato k publikaci), a následně jsme je využili k detekci B buněk a B prekurozrů v primárních krvetvorných centrech. Při použití HM57 jsme nemuseli z analyzované suspenze odstraňovat erytroidní řadu, protože během fixace a permeabilizace buněk většina červených krvinek a jejich pozdních prekursorů natolik zmenšila svůj objem, že je bylo možno vyloučit z analýzy na základě rozptylu světla a kromě toho jsme při použití HM57 mohli zviditelnit všechna CD79 α ⁺ stádia primární B lymfopoezy pro-B buňkami počínaje a nezralými B buňkami konče. Zde je nutno poznamenat, že intracelulární značení buněk MoAb HM57 zviditelňuje i nejčasnější prekursorová stádia s pouze intracelulární expresí CD79 α . Obr. 9 koresponduje s výsledky a závěry získanými povrchovým značením HSCR a potvrzuje naši hypotézu pomocí níž jsme klasifikovali základní diferenciacní stádia primární B lymfopoezy. Vazba anti-Ig κ k CD79 α ⁺ leukocytům kostní dřeně se omezuje pouze na minoritní populaci malých lymfocytů (R3 v Obr. 9A). Naproti tomu anti-Ig λ i anti-IgM MoAb značí subpopulaci velkých CD79 α ⁺ mononukleárních leukocytů (R4 v obr. 9B a C) a slabou expresi vazebných epitopů těchto protilátek lze pozorovat i u převážné většiny malých Ig κ buněk patřících k B řadě krvetvorby. Intenzita vazby anti-Ig κ a anti-Ig λ na malých (Obr. 9D) a velkých (Obr. 9E) CD79 α ⁺ buňkách kostní dřeně zřetelně ukazuje výraznou převahu buněk nesoucích malá množství Ig λ nebo jemu podobného epitopu ve frakci s nízkou hodnotou FSC (Obr. 9D) a existenci dvou subpopulací velkých (Obr. 9E) buněk s odlišným (slabě pozitivním nebo negativním) „Ig λ “ imunofenotypem.

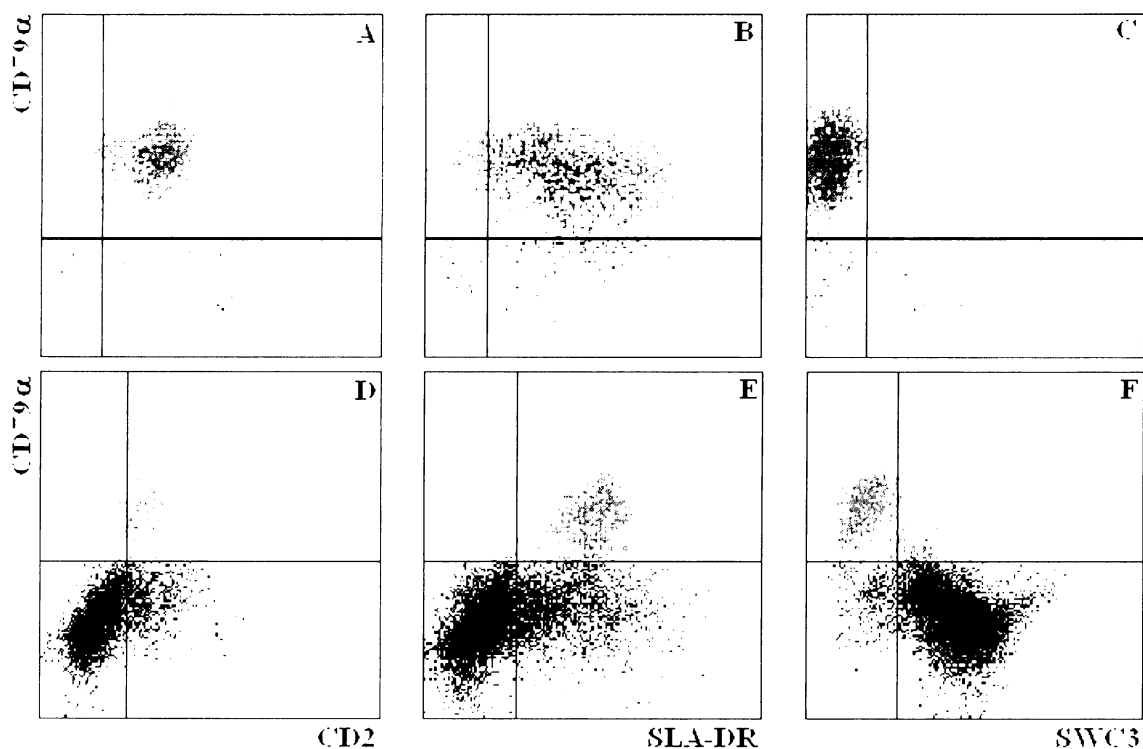


Obr. 9. *Expresle lehkých řetězců kapa a lambda a těžkého řetězce μ imunoglobulinu na povrchu $CD79\alpha^+$ buněk prasečí fetální kostní dřeně (DG950). (A) Expresle lehkého řetězce kapa. $Ig\kappa^+$ buňky se vyskytují pouze mezi buňkami s nízkým FSC (malé $CD79\alpha^+$ buňky – region R3). (B) Expresle lehkého řetězce lambda. Na obrázku jsou vidět tři populace lambda pozitivních buněk: buňky se střední až vysoké expresi lambda řetězce s nízkým FSC parametrem (nezralé B buňky, R3), buňky s velmi nízkou expresi $Ig\lambda$ nebo $Ig\lambda$ -podobného epitopu (malé pre-B II buňky, R3) a buňky s nízkou expresí lambda řetězce a vysokým FSC parametrem (velké pre-B II buňky, R4). (C) Expresle těžké řetězce μ . Na diagramu je vidět, že povrchové expresní profily μ a λ jsou velice podobné tím rozdílem, že relativní počet s μ^+ se rovná součtu λ^+ a κ^+ . Ve frakci $CD79\alpha^+$ -velkých mononukleárních buněk nejsou žádné κ ani λ pozitivní buňky.*

5.1.7 DALŠÍ FENOTYPIZACE $CD79\alpha^+$ MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK FETÁLNÍ PRASEČÍ KOSTNÍ DŘENĚ

Jak již bylo řečeno výše (5.1.5.), B buňky imunologicky naivních prasat jsou $CD2$ pozitivní, přičemž podle předchozích výsledků můžeme odvozovat, že expresle $CD2$ na povrchu B lymfocytárních prekurzorů předchází membránové expresi IgM . Při tomto experimentálním uspořádání ale nelze s jistotou rozlišit B prekurzory, které ještě nedokončily přeuspořádání genů pro Ig (pro-B). Tuto nevýhodu můžeme částečně odstranit, značíme-li buňky kostní dřeně s $CD2$ intracelulárně $CD79\alpha$. Abychom minimalizovali kontaminaci

vzorků buňkami jiných lymfoidních linií, používali jsme buňky kostní dřeně fétů mezi DG 90 a DG 100, kdy je v kostní dřeni soustředěna veškerá B lymfopoéza a zároveň ještě nenastává předporodní myelotická vlna. Na výstupu z průtokového cytometru odlišíme dvě CD2 pozitivní populace buněk: $CD2^+CD79\alpha^-$, $CD2^+CD79\alpha^+$. Všechny malé mononukleární buňky kostní dřeně jsou přitom $CD2^+CD79\alpha^+$ (obr. 10A). Tato skupina buněk zřejmě odpovídá $CD2^+IgM^-$ populaci na obr 10F. Subpopulace $CD2^+CD79\alpha^-$ je tedy tvořena výhradně velkými mononukleárními buňkami (obr 10B). Podobná situace nastává u značení MHCII/CD79 α . Zatímco všechny malé buňky jsou $CD79\alpha^+MHCII^+$ (obr 10B), u části FSC^{hi} buněk detekujeme pouze expresi MHCII (obr 10E). Nejzajímavější výsledky poskytuje dvojí značení SWC3/CD79 α . SWC3 je důležitý vývojový marker prasečích B buněk, nachází se na nejranějších B buněčných prekurzorech a jeho exprese postupně vyhasíná s přechodem buněk v pre-BI stadiu, až se zcela ztrácí u pre-BII buněk. Populace malých buněk má uniformní expresní profil - $CD79\alpha^+SWC3^-$ (obr 10C). Skupina velkých mononukleárních buněk je však rozrůzněna na tři populace: $CD79\alpha^+SWC3^-$, $CD79\alpha^+SWC3^+$ a $CD79\alpha^-SWC3^+$ (obr 10F). Populace $CD79\alpha^+SWC3^-$ pravděpodobně odpovídá zralejším stadiům B lymfopoézy, které nalézáme i na obr. Xx D a E jako buňky nesoucí i MHCII a CD2 a v souladu s obr. 10F exprimuje část z nich pravděpodobně i povrchový IgM. Jedná se tedy o pre-B buňky ve stadiu pre-BI a pre-BII. Nejzajímavější se jeví unikátní populace $CD79\alpha^+SWC3^+$ buněk. Přítomnost CD79 α molekuly v cytoplasmě je jednoznačně řadí k B buněčné linii. Zároveň však přetrvávající exprese SWC3 antigenu ukazuje na velmi nízký stupeň diferenciaci těchto elementů v rámci B lymfopoézy. Vzhledem k tomu, že jsme nikdy nedetekovali současnou expresi sIgM a SWC3, znamená to, že exprese SWC3 ustává ještě před definitivním přeskupením genů pro Ig. Na druhou stranu exprese CD79 α nebyla zatím zcela uspokojivě prokázána, ačkoli jí nelze vyloučit. S přihlédnutím k těmto faktům, $CD79\alpha^+SWC3^+$ elementy tedy pravděpodobně představují populaci pre-BI buněk. $CD79\alpha^-SWC3^+$ populace snad zahrnuje určité množství velmi ranných prekurzorů B lymfopoézy a zřejmě i hematopoetické kmenové buňky. Na záznamech z průtokového cytometru je však nelze identifikovat, neboť jsou zcela překryty SWC3 pozitivními buňkami myelo-monocytární linie.



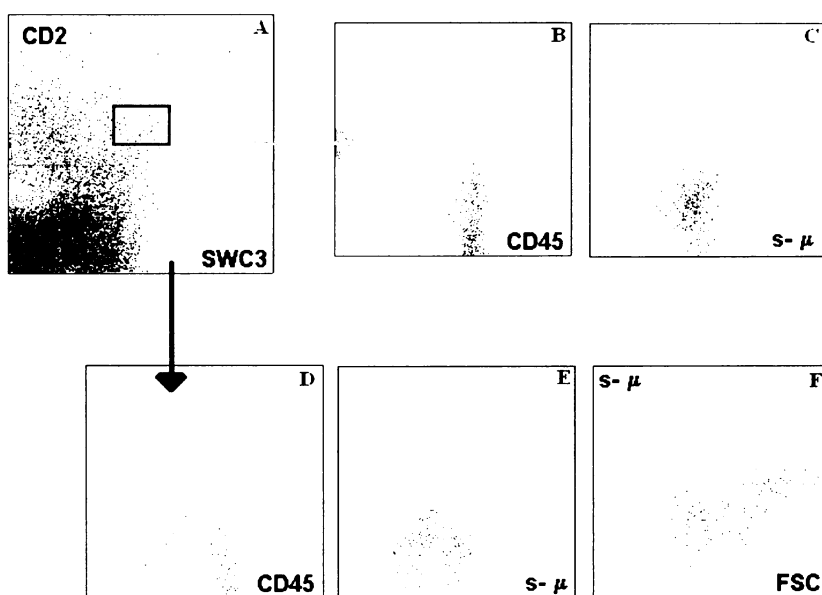
Obr. 10. Fenotypizace mononukleárních bunek fetální kostní dřeně (DG95). Analýza ukazuje rozdíly mezi malými (A, B, C) a velkými (D, E, F) mononukleárními buňkami kostní dřeně. Všechny buňky s nízkým FSC parametrem exprimují CD79 α , CD2 a MHCII a jsou SWC3 negativní, což ukazuje na vyšší stupeň jejich diferenciaci. Naopak v množině buněk s vysokou hodnotou FSC parametru se nachází subpopulace CD79 α negativních buněk, které ale exprimují CD2 a SLA-DR. Navíc je mezi FSC^{hi} buňkami unikátní populace buněk, které již exprimují CD79 α , ale dosud neztratily expresi SWC3.

5.1.8. KULTIVACE

CD79 α ⁺SWC3⁺ prekurzorové buňky bylo možno snadno detekovat pomocí průtokové cytometrie, ale vzhledem k technice značení nebylo možno používat k dalším experimentům, vyžadujícím živé buňky. Snažili jsme se tedy najít jinou vhodnou kombinaci znaků, která by umožnila tříditi tyto buňky ze směsi při současném zachování jejich viability. Na základě těchto cytometrických analýz jsme dospěli k závěru, že SWC3/CD2 dvojitě pozitivní buňky (obr 11A) představují prekurzorová stadia B lymfopoézy, pravděpodobně stádium na pomezí pro-B/preB před přeskupením genů pro těžké řetězce imunoglobulinu. Další vývojové stádium buněk B řady by tedy mělo mít za sebou přeskupení a na povrchu exprimovat sIgM. Z buněk prasečí fetální kostní dřeně jsme sortovali SWC3/CD2 pozitivní

buňky a $CD2^+SWC3^-$ buňky jako kontrolu (obr. 11). Čistota vytríděných buněk přitom podle zpětných analýz představovala více než 98%.

Tyto buňky byly kultivovány na 24 jamkových deskách s předem připravenými podpůrnými buňkami (stromální buňky fetálního thymu) po dobu tří týdnů. Po skončení kultivace byly buňky označeny anti-CD45 a anti-IgM-FITC. Výsledky měření na průtokovém cytometru jsou znázorněny na obr. 11. V populaci SWC3/CD2 pozitivních buněk došlo k rozštěpení leukocytů na dvě subpopulace, z nichž jedna byla povrchově pozitivní pro sIgM. Zároveň se tyto buňky rozpadají na dvě populace o rozdílné hodnotě FCS parametru.



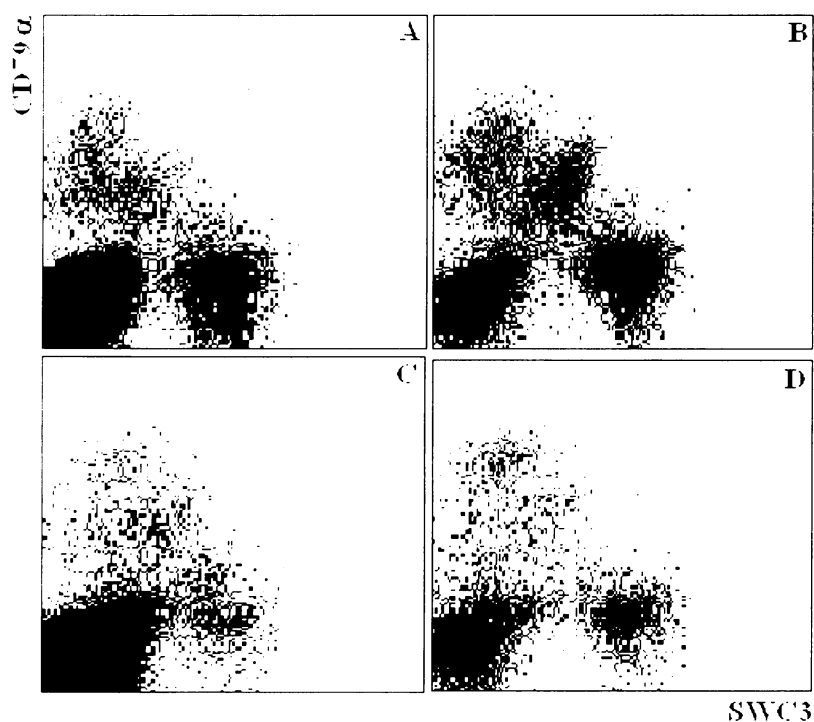
Obr. 11. Značení a výběr populací při třídění buněk (A). Po třech týdnech kultivace byly buňky sklizeny a značeny CD45 a IgM. V buněčných suspenzích se nacházely pouze CD45 pozitivní buňky (B, D). Všechny $CD2^+SWC3^-$ buňky byly IgM pozitivní (C), zatímco $CD2/SWC3$ pozitivní buňky se rozpadaly na dvě populace jak podle exprese IgM (E), tak podle velikosti (F).

5.1.9. DETEKCE BUNĚK B LYMFOIDNÍ LINIE VE FETÁLNÍCH ORGÁNECH

PRASAT

Lokalizace B lymfopoézy se během ontogeneze savců mění současně s přesouváním funkce primárního hematopoetického orgánu a to zejména během fetálního vývoje (viz. 3.1.). Samotný princip vývoje B buněk od pro-B až po nezralé B buňky opouštějící lymfopoetická centra ale zůstává v průběhu ontogeneze nezměněn. Existenci lymfopoézy v primárních centrech dokazuje přítomnost vývojových prekurzorů a/nebo přítomnost specifických enzymů (RAG, TdT), případně zvýšená úroveň apoptózy, ačkoli toto kritérium samo o sobě může být zavádějící. Během vývoje prasečích fétů dochází v zásadě ke třem hlavním přesunům hematopoézy. První lymfocyty lze detekovat ve žloutkovém vaku, po jeho zániku (DG 24) se lymfopoéza přesouvá do jater a okolo DG 50 postupně přechází krvetvorba do kostní dřeně, kde setrvává do konce života jedince. Jestliže tedy jsou $CD79\alpha^+SWC3^+$ buňky rannými prekurzory B lymfopoézy, jak bylo řečeno v (5.1.7.), měly by se v průběhu gestace vyskytovat ve výše uvedených orgánech podle daného časového schématu.

Na obr. 12 jsou shrnuty výsledky analýz lymfocytů izolovaných těsně před polovinou gestace z fetálních orgánů. Vidíme, že maximum $CD79\alpha^+SWC3^+$ stejně jako $CD79\alpha^+SWC3^-$ buněk se nachází v kostní dřeni (obr. 12B). Podobný obraz, i když s menším počtem buněk, najdeme i ve fetálních játrech (obr. 12A). To zcela odpovídá skutečnosti, že kolem DG50 dochází k postupnému přesunu krvetvorby z jater do kostní dřeně fétů. Naopak v krvi a ve slezině se nachází jen minimum $CD79\alpha^+SWC3^+$ buněk, v krvi nad nimi navíc jednoznačně převažují $CD79\alpha^+SWC3^-$.



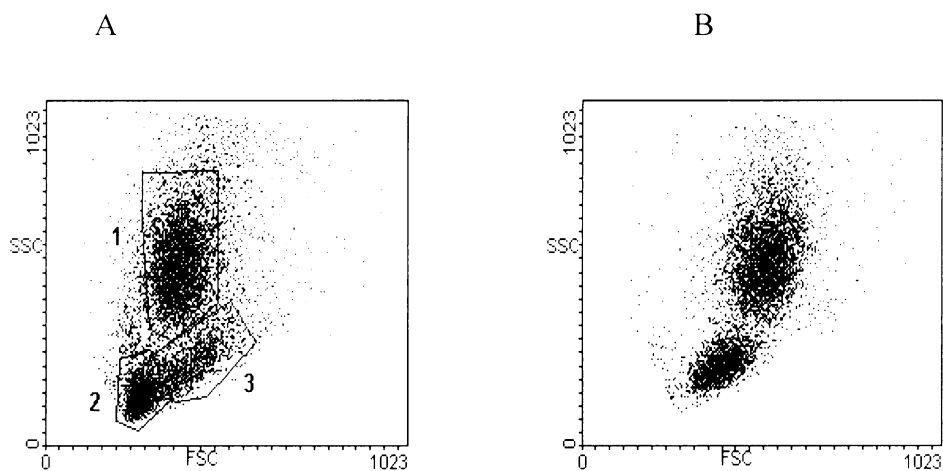
Obr. 12. Distribuce buněk B lymfoidní linie ve fetálních orgánech (DG 50). Mononukleární buňky získané desintegrací tkáně fetálních jater (A), kostní dřeně (B), sleziny (C) a mononukleární buňky periferní krve (D) byly dvojitě označeny protilátkami proti SWC3 a CD79 α . Ze srovnání těchto analýz vyplývá, že ranné prekurzory CD79 α ⁺SWC3⁺ fenotypu se v tomto období gestace nacházejí převážně v kostní dřeni. Zvýšené množství těchto buněk ve fetálních játrech potvrzuje, že okolo DG50 zde ještě probíhá hematopoéza, ačkoli většina krvetvorné aktivity se již přesunula do kostní dřeně. Přítomnost malého množství prekurzorových buněk v periferní krvi naznačuje, že část prekurzorových a snad i hematopoetických buněk koluje organismem (srov. Rossi et al, 2003).

5.2. PSÍ MODEL

Paralelně s analýzami prasečích fetálních buněk probíhal i výzkum B lymfopoezy u psů. Na rozdíl od prasat je u psů k dispozici specifická komerční protilátka proti progenitorovému markeru CD34. S její pomocí bylo možné spolehlivě určit i velmi raná vývojová stadia lymfopoezy v kostní dřeni novorozených štěňat.

5.2.1. ANALÝZA CD34 POZITIVNÍCH BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ PSŮ

V rámci experimentu byly analyzovány buňky periferní krve a kostní dřeně osmi novorozených, čtyř týdenních, čtyř dvoutýdenních, dvou měsíčních štěňat a tří dospělých psů různých ras. Erytrocyty byly odstraněny hypotonickou lýzou. Měřením na průtokovém cytometru bylo ověřeno, že u buněk rezistentních k hypotonickému šoku (HS-RC) dochází k výraznému nabohacení CD45 pozitivní frakce, přičemž nedochází ke změnám v FSC/SSC charakteristice těchto buněk (obr. 13A.). Aby byl vyloučen jakýkoli artefakt, související se zpracováním vzorku, byla kromě techniky hypotonického šoku použita k odstranění erytrocytů i lýza amonium chloridem (Easy Lyse, Dako). Zároveň byly příslušnými protilátkami značeny buněčné suspenze, které byly ošetřeny pouze WSB.

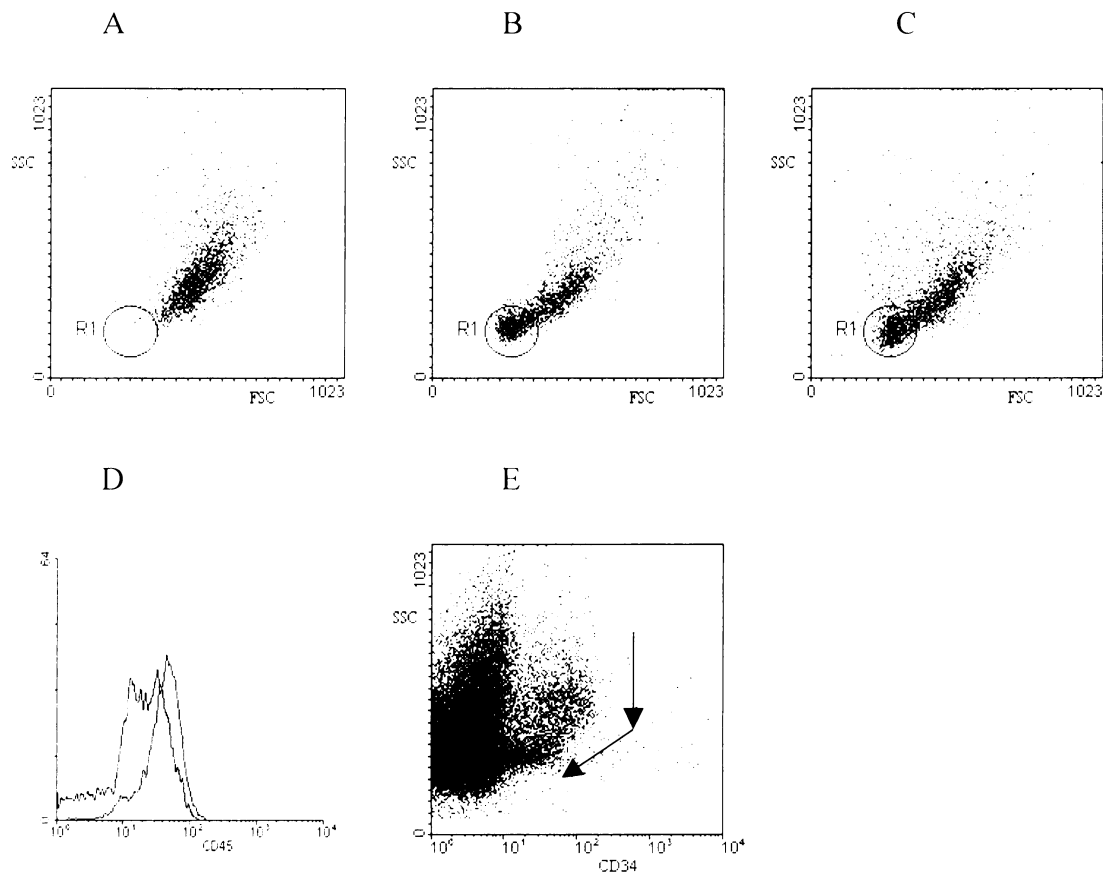


Obr. 13. FSC/SSC charakteristika HS-RC buněk kostní dřeně (A) a periferní krve (B). V kostní dřeni lze dobře rozlišit granulocyty (1), malé (2) a velké (3) mononukleární buňky.

HS-RC buňky kostní dřeně byly testovány na povrchovou expresi CD34. V souladu s dostupnými daty bylo množství těchto buněk v kostní dřeni štěňat (3-9%) podstatně vyšší než u dospělých zvířat (méně než 2%). Z hlediska parametrů FSC/SSC se jednalo o velké (FSC^{hi}), mononukleární buňky (SSC^{low}) (obr. 14.). Při porovnání různých technik zpracování

buněčných suspenzí (viz. výše) bylo zjištěno, že v kostní dřeni je obsažena populace malých, monocytárních buněk, které se jeví jako CD34^{lo}. Tato frakce byla jen v nepatrné míře zastoupena mezi HS-RC a byla negativní pro panleukocytární antigen CD45.

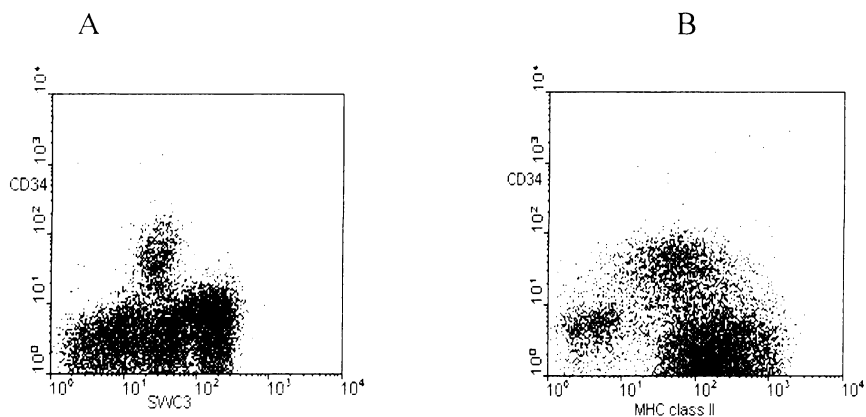
CD34⁺ HS-RC štěnat byly dále testovány pomocí panelu monoklonálních protilátek. V souladu s očekávaným nízkým stupněm diferenciaci nevykazovaly pozitivitu pro žádný z markerů linií (CD3, IgM, CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$), byly však pozitivní pro MHCII a to ve střední až vysoké densitě.



Obr. 14. FSC/SSC charakteristika CD34⁺ buněk izolovaných ze psí kostní dřeni hypotonickou lýzou (A) nebo pomocí amonium chloridu (B). Na obr. (C) je neošetřená kostní dřeň. Region malých mononukleárních buněk je označen jako R1. Na obr. (D) je porovnání exprese CD45 antigenu na HS-RC (šedá) a buňkách izolovaných z kostní dřeni pomocí amonium chloridu (bílá). (E) Celková exprese CD34 na buňkách kostní dřeni. Šipky naznačují ztrátu exprese CD34 během vývoje buněk.

Při testech možné mezidruhové křížové reaktivity bylo zjištěno, že anti-prasečí monoklonální protilátka proti SWC3 reaguje pozitivně s frakcí psích CD45 pozitivních buněk. Podle postavení těchto buněk na FSC/SSC grafu bylo určeno, že s anti-pig SWC3 reagují – stejně jako u prasat- všechny granulocyty. U prasat se ale tento antigen zároveň objevuje na

raných prekurzorech hematopoézy. HS-RC buňky kostní dřeně štěnat byly tedy dvojité označeny anti-CD34 a zároveň protilátkou anti-SWC3. Tento experiment prokázal, že prekurzorové CD34⁺ HS-RC buňky jsou zároveň SWC^{lo}. (obr. 15.) To je v souladu s pozorováním o nízké hustotě SWC3 antigenu na prvních pozorovatelných buňkách leukocytární řady (Summerfield and McCullough, 1997).



Obr. 15. Dvojité barvení HS-RC buněk psí kostní dřeně. (A) SWC3/CD34 a (B) MHCII/CD34

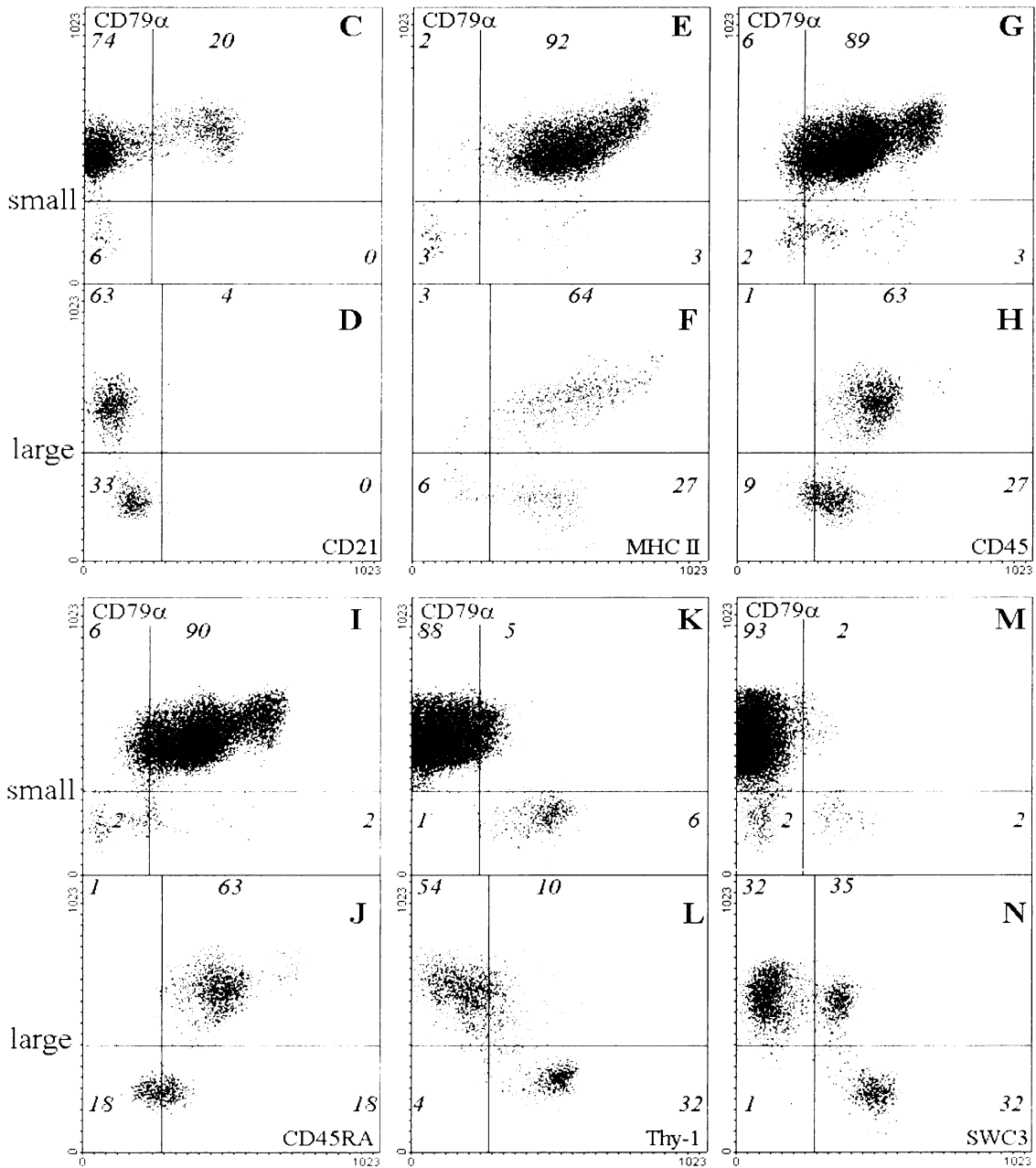
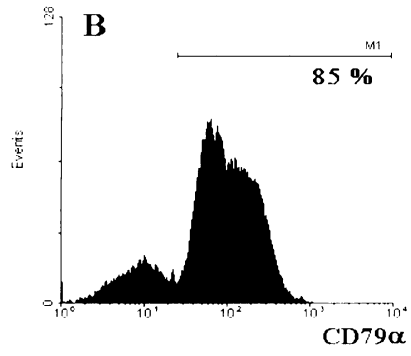
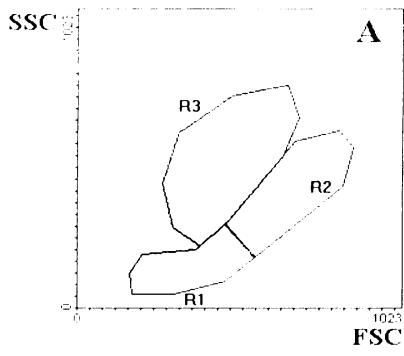
5.2.2. PREKURZORY B BUNĚČNÉ LINIE V KOSTNÍ DŘENI PSŮ

Pro stanovení množství a fenotypu buněk spadajících do B buněčné řady bylo napřed třeba nalézt vhodný marker. Zvolili jsme protilátku proti lidskému CD79 α (HM57, Dako Cytomation) vzhledem k její široké mezidruhové křížové reaktivitě, která byla již dříve ověřena (Jones et al., 1993; Mason et al., 1991). Na buňkách periferní krve bylo ověřeno, že všechny buňky, které jsou CD79 α ⁺ nesou zároveň povrchový IgM a jedná se tedy bezpochyby o B lymfocyty. Nyní bylo možno přistoupit k testování HS-RC buněk kostní dřeně dvojitým značením CD79 α a panelem protilátek. Výsledky jsou na obr. 16. U novorozených štěnat je více než 80% HS-RC buněk kostní dřeně pozitivních pro CD79 α . Tyto buňky byly zároveň pozitivní pro MHCII a to nezávisle na své velikosti. MHC antigeny druhé třídy se také vyskytovaly na nezanedbatelné populaci CD79 α ⁻ buněk. Exprese CD21 a míra exprese CD45 se lišila podle velikosti buněk. Zatímco na velkých HS-RC buňkách se znak CD21 prakticky nevyskytoval, jeho exprese byla výrazně zvýšena na malých CD79 α ⁺ buňkách. Se zmenšováním velikosti buněk zároveň docházelo ke zvyšování exprese CD45 a to zejména CD45RA izotypu.

Vzhledem k předchozím zjištěním o existenci SWC3^{lo} HS-RC bylo pro hledání možných prekurzorů B linie použito dvojí barvení CD79 α /SWC3. Na obr. 16. je jasně vidět, že zatímco malé CD79 α ⁺ buňky jsou SWC3 negativní, v případě velkých HS-RC buněk byla nalezena velká SWC3 pozitivní populace. Jestliže - v souladu se změnami exprese ostatních znaků - populace velkých HS-RC zahrnuje prekurzorová stadia lymfopoézy, pak dvojitě pozitivní CD79 α ⁺/SWC3⁺ buňky představují předchůdce B buněk někde na úrovni přechodu pro-B/pre-B buněk.

Ve snaze najít co možná nejranější prekurzory lymfopoézy v kostní dřeni bylo použito markeru Thy-1. Výsledek je na obr. 16. Zatímco CD79 α ⁺ buňky s protilátkou proti Thy-1 nereagují, malá populace CD79 α ⁻ buněk nese zároveň Thy-1 a to bez ohledu na velikost. Srovnáme-li tuto populaci s analýzou obrazu rozložení CD79 α /MHCII, vidíme, že mezi malou populací mononukleárních CD79 α ⁻ buněk převažují MHCII⁺/Thy-1⁺ dvojitě pozitivní případy. Takový fenotyp skutečně odpovídá velmi časným prekurzorům hematopoézy a to až na úrovni hematopoetických kmenových buněk nebo velmi raných programovaných prekurzorů.

Obr. 16. Dvojí exprese různých povrchových znaku s CD79 α v kostní dřeni novorozených psu. Na FSC/SSC diagramu (A) jsou jednoznačně rozlišeny granulocyty (R3) a velké (R2) a malé (R1) mononukleární lymfocyty. Většina těchto mononukleárních buněk přitom nese CD79 α . Stejně jako u prasat i u psů se exprese vybraných znaku na velkých (D, F, H, J, L, N) a malých (C, E, G, L, K, M) mononukleárních buňkách významně liší.



6. DISKUSE

6.1. PŘÍPRAVA SPECIFICKÝCH MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK PROTI POVRCHOVÝM MOLEKULÁM PRASEČÍCH LYMFOCYTŮ.

Ačkoli je prase dobře etablovaným biomedicínským modelem, stále není vyvinut dostatek komerčně dostupných specifických reagentů. Abychom obešli tento nedostatek, pokusili jsme se jednak vyvinout vlastní specifické monoklonální protilátky, jednak otestovat případnou křížovou reaktivitu protilátek vyvinutých proti lymfocytárním molekulám jiných druhů.

Při vývoji monoklonálních protilátek jsme využili dvou strategií. Jednak jsme se pokoušeli o vývoj specifických protilátek proti prasečí molekule CD19, obecnému markeru B lymfocytů. Antigenem použitým při imunizaci byl v tomto případě protein izolovaný z bakterií *E. coli*, kam byl předtím vložen expresní vektor s naklonovaným genem pro extracelulární část prasečího CD19. Hybridomy získané buněčnou fúzí byly testovány metodou ELISA na přítomnost protilátek a z pozitivních klonů bylo dále vybráno 11, z nichž 4 rozeznávaly s vysokou afinitou použitý antigen na Western Blotech. Při použití nativního antigenu (buňky prasečí kostní dřeně a krve) však ani jedna ze 4 protilátek na průtokovém cytometru neposkytovala žádnou pozitivní reakci. Protilátky tedy dobře rozeznávaly proteinové lyzáty, nikoli však protein v nativním stavu. To ovšem není až tak překvapivé. Za normálních podmínek je extracelulární část proteinu glykosylována. V bakteriích ovšem k takové posttranslační modifikaci nedochází. Protilátky vzniklé v odpověď na neglykosylovaný protein tedy pravděpodobně rozeznávají epitopy, které 1) v nativním proteinu neexistují (protein vlivem posttranslačních modifikací získává jinou konformaci) nebo 2) jsou skryty uvnitř nativní konformace nebo překryty cukernými molekulami. Ani jedna ze čtyř vytvořených monoklonálních protilátek tedy sice není použitelná na nativní protein, stále však mohou být velmi užitečné pro molekulárně genetické studie.

Cílem výše uvedeného postupu bylo získání protilátek proti konkrétním molekulám. Takový přístup ale vyžaduje molekulárně-biologickou charakterizaci daného genu a/nebo jeho produktu. Zdaleka ne všechny povrchové molekuly prasečích lymfocytů jsou takto důkladně prozkoumány. Zejména v případě prekurzorových markerů není často znám prasečí analog proteinů, které se běžně používají pro výzkum myších lymfocytů a klinickou diagnostiku lidských krevních buněk. Proto jsme jako druhou imunizační strategii zvolili přímou aplikaci

buněk prasečí fetální kostní dřeně. Klíčovým bodem tohoto pokusu byl výběr antigenu. Buňky pro imunizace myši jsme získávali z kostní dřeně fétů kolem 90. dne gestace. Před tímto datem je izolace kostní dřeně fétu technicky relativně obtížná a nedosáhli bychom potřebného výtěžku. Naopak po DG90 se začíná zvyšovat podíl myeloidních buněk v kostní dřeni v souvislosti s přípravou na porod. Kolem DG90 jsme předpokládali (podle předchozích pokusů) převahu monocytárních buněk náležejících k B linii. Čistotu této frakce jsme navíc zvyšovali čištěním na Ficollovém gradientu. Přesto zřejmě v antigenní směsi podávané myším zůstal jistý podíl myeloidních buněk. Ačkoli tvořil jen velmi malé procento antigenní směsi (2-3%), velká část získaných hybridomů produkovala protilátky proti myeloidním antigenům. Je možné, že antigeny nesené myeloidní linií jsou imunogenější než jiné. Pravděpodobné vysvětlení však spočívá v relativním množství antigenu. Je-li hustota toho kterého antigenu na povrchu buněk vysoká, stačí i malé množství buněk k masivní imunizaci experimentálních zvířat. Důležitou úlohu v tomto případě hraje nepochybně i specifická glykosilace (α -gal), typická pro prasata, která je pro myši imunitní systém cizorodá. Analogicky tomu lze vysvětlit ještě podstatně vyšší procento hybridomů, produkujících „anti-pan“ protilátky (tj. reagující se všemi leukocyty). Jejich specifita nebyla stanovována, ale lze předpokládat, že se jednalo především o protilátky proti obecným leukocytárním antigenům (CD45). Je také možné, že protilátky produkované hybridomy vykazovaly silnou vazbu na Fc receptory. Nicméně je nepravděpodobné, že by tomu tak bylo u všech získaných supernatantů. Mimo to, při testech supernatantů jsme používali standartní metody značení a blokování, které se ve všech ostatních případech ukázaly jako velmi účinné.

Výše uvedené komplikace jsme očekávali již při výběru antigenu – množství pan-leukocytárních protilátek je vždy produktem imunizací celými leukocyty. Očekávali jsme ale, že se mezi tisíci získaných hybridomových buněk podaří najít takové, které produkují protilátky o unikátní specifitě. Žádné takové jsme však nedokázali specifikovat. Hlavní překážkou bylo zřejmě malé množství takových hybridomových buněk. Citlivější metoda by je snad dokázala odhalit, nicméně při prověřování hybridomů je důležitá i rychlost a jednoduchost metody a tato kritéria splňuje průtoková cytometrie dokonale.

V průběhu pokusu se navíc při pravidelném vyšetření prováděném v chovu myši ukázalo, že zvířata jsou napadena myší virovou hepatitidou. To samo o sobě vede k patologické reakci imunitního systému a nepříznivě ovlivňuje chování zvířat v pokusech.

6.2. B LYMFOPOEZA PRASAT

Jak již bylo řečeno dříve, protilátka HM57 byla původně vytvořena proti cytoplazmatické části lidského proteinu CD79 α a během jejího testování pro imunohistochemii byla záhy prokázána široká křížová reaktivita mezi savčími druhy. Abychom tuto křížovou reaktivitu potvrdili a zároveň standardizovali použití HM57 pro průtokovou cytometrii, použili jsme buňky fetální kostní dřeně prasat (DG106). Ty jsme značili jednak HM57, jednak panleukocytární protilátkou CD45.

Protilátka HM57 skutečně poskytovala na průtokovém cytometru pozitivní signál, a to asi pro 8% všech buněk kostní dřeně. Toto relativně nízké zastoupení CD79 α ⁺ buněk je odrazem převahy myeloidních buněk, která nastává v terminální fázi gestace. Na druhou stranu v pozdních stadiích gestace lze snadněji z fétů získat dostatečné množství kostní dřeně, což vyváží nižší poměrné zastoupení buněk B linie. Z promítnutí množiny všech CD79 α pozitivních buněk do FSC/SSC diagramu patrné, že všechny granulární buňky s vysokým SSC jsou CD79 α ⁻ a exprese tohoto antigenu se vztahuje pouze na lymfocyty (SSC^{lo}). Jestliže vyloučíme buňky s vysokým SSC (granulocyty a jejich prekurzory), zjistíme, že podíl HM57 pozitivních buněk stoupl na 39%. Současným značením s anti-CD45 protilátkou se prokázalo, že všechny CD79 α ⁺ buňky nesou zároveň antigen CD45. To plně odpovídá dosavadním poznatkům o vývoji lymfocytů, exprese CD45 je prokázána už u nejranějších leukocytárních buněk (Summerfield and McCullough, 1997).

Šinkora et al. (1998) prokázali, že - při použití dostatečně citlivého značení - všechny prasečí B buňky prenatalně nesou znak CD2. To lze opětovně prokázat pomocí dvojího značení CD2/IgM. Ve fetální kostí dření jsou všechny sIgM buňky zároveň CD2 pozitivní. Naopak, pouze jedna třetina CD2⁺ buněk nese na povrchu IgM. Podle učebnicového modelu je CD2 znakem především buněk T linie, kde je exprimována od nejranějších dvojité negativních thymocytů. Nicméně, kdyby se jednalo o T buňky nebo jejich prekurzory, alespoň část z nich by musela nést molekulu CD3, přičemž z obr. 7. jednoznačně vyplývá, že ve fetální kostní dření se žádná taková populace nevykytuje. Navíc podle všech dosud získaných poznatků probíhá vývoj T lymfocytů výlučně v thymu. Všechny CD2 pozitivní buňky kostní dřeně tedy spadají do B buněčné linie. Navíc, vzhledem k tomu, že neexistuje IgM⁻CD2⁻ populace a pouze třetina CD2⁺ buněk exprimuje současně IgM, exprese CD2 musí předcházet povrchové expresi IgM. Zároveň z analýzy IgM/CD2 expresních diagramů přitom vyplývá, že mononukleární buňky kostní dřeně lze rozdělit podle hodnoty parametru

FSC na kompaktní populaci malých (FSC^{lo}) a menší skupinu velkých (FSC^{hi}) buněk. Ačkoli přímé srovnání míry exprese povrchových molekul u různě velkých buněk může být zavádějící, je jasné, že exprese sIgM na malých buňkách je podstatně vyšší než na velkých buňkách kostní dřeně. Navíc při bližší analýze zjistíme, že zatímco všechny malé mononukleární buňky kostní dřeně nesou sIgM (a zároveň CD2), ve skupině velkých buněk B buněčné linie ($CD2^+$) pouze třetina exprimuje na povrchu IgM.

Podrobná analýza exprese sIgM v závislosti na velikosti buněk (FSC) (všech respektive $CD79\alpha$ pozitivních) (obr. 8 resp. 9) potvrzuje rozdělení sIgM⁺ buněk podle velikosti na malé a velké. Poměrně kompaktní populace malých buněk exprimuje vysoká množství sIgM. Naproti tomu populace velkých buněk je co do velikosti heterogenější a exprese IgM na jejím povrchu nepřesahuje střední hodnoty (sIgM^{med}). Uvážíme-li míru exprese a velikost buněk, bude zřejmě povrchová hustota sIgM u velkých buněk velmi malá, na rozdíl od buněk malých, kde bude hustota sIgM na buněčné membráně značná. To odpovídá představám o změnách exprese sIgM v průběhu vyzrávání buněk. Po úspěšném přeskupení genů pro těžký řetězec Ig (large pre-BII) je exprimován preB receptor. Ten slouží výhradně jako signál o úspěšném dokončení genového přeskupení a je distribuován na povrchu velkých pre-B buněk s relativně nízkou hustotou. V dalším stadiu dochází k přeskupení genů pro lehké řetězce Ig a na povrch malých pre-BII buněk je exprimován regulerní B buněčný receptor. S vyzráváním se tedy buňky zmenšují a zároveň silně zvyšují expresi nyní již plně funkčního BCR. Toto pozorování lze potvrdit analýzou vztahu exprese lehkých řetězců imunoglobulinů a velikosti buněk. Zatímco všechny buňky nesoucí kappa řetězec spadají mezi malé buňky, velikostní rozložení λ^+ buněk odpovídá FSC distribuci buněk nesoucích sIgM. V průběhu vývoje B buněk, resp. B buněčného receptoru (viz. 3.3.2.4.) dochází ve fázi pre-B buněk k syntéze tzv. pre-BCR. Jedná se o vývojovou variantu BCR, která se skládá z plně maturovaného IgM řetězce a „náhradního“ lehkého řetězce, heterodimeru proteinů VpreB a $\lambda 5$. Řetězec $\lambda 5$ přitom sdílí značnou homologii s „definitivním“ lehkým řetězcem λ . Tato fakta nás vedou k předpokladu, že protilátka 27.7.1., specifická pro molekuly lehkých řetězců λ , se stejným způsobem váže na homologní $\lambda 5$. Je-li tomu tak, pak je přítomnost $IgM^{lo}\lambda 5^+$ buněk v kostní dřeni jednoznačným důkazem přítomnosti pre-B buněk.

Jedním z cílů práce bylo také určit lokalizaci B lymfopoézy ve fetálním těle. V rámci těchto pokusů bylo zkoumáno mnoho různých orgánů v různém stadiu vývoje. V souladu s předchozími poznatky (viz. 3.1.) jsme hlavní lymfopoetická centra nacházeli nejprve ve

žloutkovém vaku, ve druhé čtvrtině gestace v játrech a od poloviny gestace počínaje i v kostní dřeni, která se nakonec stává majoritním producentem B buněk. Nicméně jistá část prekurzorů se spolu se zralými lymfocyty se vyskytuje i mimo tyto orgány, zejména v periferní krvi. To napovídá, že se jedná o dynamický systém, kde v celém fetálním těle koluje jistá část prekurzorových buněk, které mohou na své cestě osazovat různé orgány. Nicméně pouze v primárních hematopoetických orgánech je nahloučeno velké množství buněk B linie v různých stadiích vývoje. Ostatní studované fetální orgány (thymus, střevo) poskytují jen malou populaci B buněk, která se navíc jeví značně homogenní. Není tedy pravděpodobné, že by tyto orgány mohly být významnými producenty B buněk.

Díky protilátce HM57 jsme dokázali velmi přesně rozlišit B lymfocyty a při kombinaci s dalšími markery i jejich vývojové stadium. Protilátka HM57 je ale intracelulární a tak jí nebylo možno použít, když jsme potřebovali rozpoznat a oddělit živé buňky. Bylo tedy třeba zvolit jinou kombinaci extracelulárních znaků, pomocí níž bychom odlišili jednotlivá vývojová stadia B buněk. Z těchto znaků jsme zvolili SWC3, které je výsadním znakem raných prekurzorů B buněk. Jako druhý znak jsme použili CD2, vzhledem k tomu, že podle (5.1.5.) je prenatalně exprimován na všech B buňkách a jeho exprese předchází IgM. Pomocí kombinace těchto znaků bylo možno rozlišit tři populace buněk: $CD2^+SWC3^-$, $CD2^+SWC3^+$, $CD2^-SWC3^+$. $CD2^+SWC3^-$ v periferní krvi novorozenečel představují směšnou populaci T a B lymfocytů. V kostní dřeni se však T lymfocyty prakticky nevyskytují (obr. 7) a veškeré $CD2^+SWC3^-$ patří tedy k B buněčné řadě. Ztráta exprese SWC3 přitom znamená, že se jedná o relativně vyžralé B buňky, z nichž alespoň třetina exprimuje IgM (obr. 7). $CD2^+SWC3^+$ buňky jsou z hlediska výzkumu B lymfopoey nejzajímavější. Současná exprese obou markerů naznačuje, že buňky sice nemají přeskupené geny pro těžké řetězce Ig (exprese SWC3), ale již jsou součástí B buněčné linie (CD2) a pravděpodobně jsou tedy obdobou $CD79\alpha^+SWC3^+$ velkých buněk z obr. 10 F. $CD2^-SWC3^+$ představují buňky myelomonocytární linie s příměsí velmi raných prekurzorů hematopoey. Z těchto tří populací jsme pro kultivace *in vitro* třídili jednak $CD2^+SWC3^+$ buňky, které byly cílovou experimentální populací, jedna $CD2^+SWC3^-$ buňky. Ty v našich pokusech sloužily jako IgM pozitivní kontrola, neboť $CD2^-SWC3^+$ buňky nebylo možno použít, vzhledem k tomu, že se jednalo o směšnou populaci.

Vytříděné buňky kostní dřene jsme pěstovali *in vitro* na podpůrné vrstvě (feeder layer) buněk thymového stromatu. Thymové mikroprostředí je do jisté míry podobné prostředí v kostní dřeni: interakce lymfoidních buněk se stromatem jsou zprostředkovávány podobnými ligand-receptorovými komplexy a cytokin IL-7 nezbytný pro vývoj T lymfocytů

v thymu zároveň stimuluje přeskupování genů pro těžké řetězce Ig v prekurzorech B buněk (Namen et al., 1988). Tyto podobnosti by svědčily o schopnosti thymového stromatu poskytovat vhodné mikroprostředí pro vývoj B buněk a také existuje celá řada studií, které tuto schopnost *in vitro* potvrzují a využívají. Na druhou stranu recentní studie ukazují, že vývoj B buněk je v thymu aktivně blokován, možná mechanismem zahrnujícím Notch 1 aktivitu (Hashimoto et al.; 2002). Nicméně v podmínkách krátkodobých kultivací v jedné vrstvě převažuje pozitivní efekt thymových stromálních buněk a B buňky odvozené z kostní dřeně v takových kulturách dobře prosperují.

Po třech týdnech kultivace jsme předpokládané prekurzorové ($CD2^+SWC3^+$) i kontrolní ($CD2^+SWC3^-$) buňky sklidili a značili pro průtokovou cytometrii CD45 a IgM (obr. 11.) Zatímco –podle očekávání– všechny $CD2^+SWC3^-$ buňky vykazovaly expresi IgM, původně homogenní populace $CD2^+SWC3^+$ buněk se rozštěpila na dvě subpopulace, z nichž jedna na povrchu vystavovala sIgM. To přímo ukazuje na kapacitu $CD2/SWC3$ buněk projít přeskupením genů pro IgM a jeho následnou expresi. Bylo by jistě možné namítnout, že v kultuře nedošlo k žádnému přeskupení *de novo* vzniku IgM, nicméně současná exprese SWC3 a IgM nebyla nikdy zaznamenána a čistota třídění buněk přesahovala 98%. Navíc jsme záměrně třídili - i když částečně na úkor výtěžku - $CD2^+$ buňky s maximální expresí SWC3, abychom minimalizovali pravděpodobnost znečištění jinou populací buněk. Po kultivaci navíc dochází k rozpadu původních $CD2/SWC3$ do dvou populací podle hodnot FSC, což odpovídá naší představě o rozdělení vývojových stadií B buněk podle velikosti. Zdánlivým paradoxem je přitom opticky vyšší exprese IgM na větších buňkách. Je ale nutno podotknout, že při cytometrických analýzách větší buňky vykazují vyšší expresi běžných povrchových molekul, což je dáno právě jejich větší velikostí. Nízká až střední míra exprese IgM na velkých buňkách je dobře dokumentována na obr. 11. Podrobnější analýzy by jistě umožnily utvořit mnohem jednoznačnější závěry, celkový výtěžek buněk po třídění a kultivacích byl ovšem tak nízký, že bylo možno použít pouze velmi omezený panel protilátek a to navíc jen v přímém značení, aby se minimalizovaly ztráty při promývání buněk.

6.3. B LYMFOPOEZA PSŮ

Paralelně s výzkumem fetální kostní dřeně prasat probíhaly i analýzy mononukleárních buněk kostní dřeně psů. Jednoznačnou identifikaci a analýzu raných lymfopoetických prekurzorů u psů umožnilo použití specifické anti-CD34 protilátky. Taková protilátka u prasat dosud není dostupná a výše zmíněná anti-psí protilátka nevykazuje žádnou křížovou reaktivitu s prasečími lymfoidními buňkami. Zastoupení CD34⁺ buněk v kostní dřeni psů klesá s věkem: 3-9% při narození oproti 1-3% dospělých zvířat, což je zcela v souladu jak s teorií, tak s předchozími výsledky (Hägglund et al., 2000). Na rozdíl od dříve publikovaných výsledků (McSweeney et al.; 1998) v našich vzorcích HS-RC CD34⁺ mononukleární buňky psí kostní dřeně vykazují vyšší hodnoty FCS parametru. To je zcela v souladu s představou o vyšší velikosti prekurzorů. Jestliže jsou buňky kostní dřeně ošetřeny jinými metodami (ammonium chlorid), lze najít CD34 pozitivní buňky i ve frakci malých mononukleárních buněk. Tato skupina malých CD34⁺ buněk je ale zároveň negativní jak pro CD45, tak pro MHCII a zřejmě ji lze přiřadit k erytroidní linii hematopoézy. Skutečné lymfoidní prekurzory tedy skutečně spadají do frakce velkých mononukleárních buněk kostní dřeně.

Jednoznačné určení prekurzorů pomocí CD34 nám umožnilo otestovat některé hypotézy, které jsme si vytvořili při studiu prasečího modelu. Konkrétně jsme se zajímali o molekulu SWC3 (SIRP, CD172), jejíž expresní profil u prasat z ní dělal slibného kandidáta na znak raných prekurzorů. Protilátka DH59B (anti-SWC3) byla testována na mnoha živočišných druzích v rámci „First International Swine Cluster of Differentiation Workshop“ a byla jednoznačně prokázána její křížová reaktivita s psími leukocyty, přičemž expresní profil SWC3 v periferní krvi je podobný jako u ostatních druhů. Dvojí značení CD34/SWC3 prokázalo, že všechny CD34⁺ mononukleární buňky kostní dřeně nesou zároveň SWC3 ve střední denzitě. To plně odpovídá charakteristice prekurzorů prasečí lymfopoézy jako CD45⁺SWC3^{lo} buněk, která je běžně uznávána mnoha autory. Podobné výsledky navíc byly dosaženy i na lidském modelu, kde byla prokázána exprese SIRP-1 α na progenitorech v kostní dřeni. Tato data ukazují, že SWC3 může být použit jako spolehlivý marker raných prekurzorů u druhů, kde není dostupná jiná protilátka, včetně prasete.

Stejně jako u DH59B byla prokázána křížová reaktivita se psími B lymfocyty i pro HM57 (anti-CD79 α). U novorozených štěňat je více než 80% HS-RC buněk kostní dřeně pozitivní pro CD79 α , přičemž tyto buňky lze opět rozdělit na malé a velké. Všechny tyto buňky a poměrně velká část CD79 α ⁻ buněk byla zároveň pozitivní pro MHCII. To je

pochopitelné, neboť distribuce MHCII se zdaleka neomezuje na B buňky a u novorozených savců nezanedbatelnou část kostní dřeně tvoří myeloidní MHCII pozitivní buňky. Exprese dalších markerů se - stejně jako u prasat - výrazně liší mezi malými a velkými buňkami. Znak CD21 se téměř nevyskytoval na velkých mononukleárních buňkách, ale na malých buňkách byla jeho exprese výrazně zvýšená. Se zmenšováním velikosti buněk zároveň docházelo ke zvyšování exprese CD45 a to zejména CD45RA izotypu. To je zcela v souladu s představou o postupném vyžívání a - zároveň - zmenšování buněk v kostní dřeni - exprese CD21 (receptoru pro C3dg fragment komplementu) se objevuje u B buněk ve stadiu nezralých B lymfocytů před opuštěním kostní dřeně. Sestřihová forma regulační molekuly CD45RA je obecně pokládána za známku vyššího vývojového stadia lymfocytů. Pro dvojí značení CD79 α /SWC3 je situace u psů podobná jako v prasečí kostní dřeni. Na cytometrickém diagramu můžeme rozlišit jednak populaci B buněk a zralejších prekurzorů (od stadia pre-B) (CD79 α ⁺SWC3⁻), jednak populaci CD79 α ⁺SWC3⁺, o níž předpokládáme, že obsahuje buňky ve stadiu na pomezí pro- pre-B, které přeskupují geny pro těžké řetězce Ig. Zatímco v případě prasečích CD79 α ⁺SWC3⁺ buněk se toto tvrzení opírá o současnou nepřítomnost IgM (buňky nevystavují na povrchu produkt přeskupeného genu), u psů můžeme tuto tezi navíc podepřít argumentem, že všechny CD34⁺ buňky nesou zároveň SWC3. To sice neznamená, že všechny SWC3⁺ buňky jsou i CD34⁺ (což by ukazovalo zároveň na současnou expresi CD34 a CD79 α , která se nezdá být příliš pravděpodobná), ale rozhodně to poukazuje na velmi rannou expresi SWC3 a její spojitost s hematopoetickými prekurzory. Exprese SWC3 na velkých CD79 α ⁺ buňkách je tedy zřejmě znakem nízké vyžralosti těchto B prekurzorů. Na druhou stranu žádná z CD79 α ⁺ buněk nenesou Thy-1 marker (obr 16.). Exprese Thy-1 je prokázána na počátečních stadiích hematopoezy, u hematopoetických kmenových buněk nebo nejranějších programovaných prekurzorů (lymfoidního a myeloidního). Buňky nesoucí CD79 jsou již pevně předurčeny pro B buněčnou řadu a nachází se ve vývojové posloupnosti hematopoezy dále než Thy-1⁺ buňky. CD79 α ⁺SWC3⁺ tedy představují buňky vyžralé na úroveň jednoznačného předurčení pro B řadu, ale dosud nesoucí některé starší ontogenetické znaky (SWC3), což odpovídá stadiu pro-/pre-B, rozhodně před přeskupením genů pro těžký řetězec Ig.

7. ZÁVĚR

Výsledky dosažené v této práci lze shrnout následujícím způsobem:

Ve snaze vytvořit nové, dosud nedostupné druhově specifické monoklonální protilátky jsme imunizovali myši jednak rekombinantním proteinem, jednak živými mononukleárními buňkami kostní dřeně. Buněčná fúze dala vzniknout stovkám hybridomových klonů, které byly testovány na produkci protilátek proti příslušným antigenům. Přes veškerou snahu se však nepodařilo vytvořit monoklonální protilátku, rozeznávající nové, unikátní epitopy.

Pomocí panelu monoklonálních protilátek byla detailně studována exprese B buněčných znaků v různých stádiích B lymfopoézy. Za hlavní diferenciací znak B buněčné linie jsme přitom považovali molekulu CD79 α , která se vyskytuje již ve stadiu pro-B buněk. Potvrdili jsme expresi CD2 na B buněčných prekurzorech, pravděpodobně již od stadia pro-B, čímž exprese CD2 předchází povrchové expresi μ řetězce. Zároveň jsme prokázali různé úrovně exprese μ v závislosti na ontogenetickém stadiu B buněk. Frakce velkých (FSC^{hi}) s nízkou expresí μ zároveň reagovala s protilátkou 27.7.1. (anti- λ). To nás vedlo k vyslovení teorie, že protilátka pravděpodobně reaguje s proteinem λ 5, který je součástí pre-B receptoru a jedná se tedy o velké pre-B buňky. Pomocí protilátky proti SWC3 se nám pak podařilo identifikovat velmi časně prekurzory B buněk na pomezí pro- a pre-B buněk. Sledováním lokalizace těchto prekurzorů ve fetálním těle jsme potvrdili ontogenetickou časovou a funkční posloupnost umístění hlavních B lymfopoetických center ve žlutkovém vaku, fetálních játrech a nakonec v kostní dřeni. Část lymfoidních prekurzorů nicméně zřejmě putuje zcela volně fetálním tělem.

Hypotézy vzniklé při výzkumu B lymfopoézy prasat jsme následně ověřovali expresí analýzou mononukleárních buněk kostní dřeně psů různého stáří. Díky existenci specifické protilátky anti-CD34 bylo možno prozkoumat i nejranější stadia B-lymfopoézy psů. Protože zároveň psi mononukleární buňky kostní dřeně křížově reagují s anti-prasečí protilátkou proti SWC3, bylo možné pozorovat expresi této klíčové molekuly u CD34 pozitivních buněk. Tyto testy potvrdily, že všechny CD34 pozitivní mononukleární buňky psi kostní dřeně zároveň nesou na svém povrchu molekulu SWC3. To prokazuje, že SWC3 lze použít jako specifický znak ontogeneticky časných stadií lymfopoézy.

8. CITOVANÁ LITERATURA

- Alvarez B., Sánchez C., Bullido R., Marina A., Lunney J., Alonso F., Ezquerra A., Domínguez J.; 2000. A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Tissue Antigens*, 55: 342-351
- Andersen J.K., Takamatsu H., Oura C.A.L., Brookes S.M., Pullen L., Parkhouse R.E.M.; 1999. Systemic characterization of porcine ileal Peyer's patch. I. Apoptosis-sensitive immature B cells are the predominant cell type. *Immunology*, 98: 612-621.
- Appleyard G.D. and Wilkie B.N.; 1998. Porcine CD5 gene and gene product identified on the basis of inter-species conserved cytoplasmic domain sequences. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 60: 275-283
- Arcangeli M.L., Lancrin C., Lambolez F., Cordier C., Schneider E., Rocha B., Ezine S.; 2005. Extrathymic hemopoietic progenitors committed to T cell differentiation in the adult mouse. *J Immunol.*, 174:1980-8.
- Binns R.M.; 1982. Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 3: 95-146.
- Binns R.M., Duncan I.A., Powis S.J., Hutchings A., Butcher G.W.; 1992. Subsets of null and gamma delta T-cell receptor+ T lymphocytes in the blood of young pigs identified by specific monoclonal antibodies. *Immunology*, 77: 219-227.
- Bischof R.J., Lee R., Lee C.S., Meeusen E.; 1996. Dynamic changes in the lymphocyte subpopulations of pig uterine lymph nodes. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 51: 315-324.
- Boersma W.J.A., Zwart R.J., Sinkora J., Rehakova Z., Haveson K., Bianchi A.T.J.; 2001. Summary of workshop findings for porcine B-cell markers. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 80: 63-78
- Blue M.L., Daley J.F., Levine H., Craig K., Schlossman S.F.; 1986. Biosynthesis and surface expression of T8 by peripheral blood T4+ cells in vitro. *J. Immunol.* 137: 1202-1207.
- Bradl H., Wittmann J., Milius D., Vettermann C., Jack H.M.; 2003. Interaction of murine precursor B cell receptor with stroma cells is controlled by the unique tail of lambda 5 and stroma cell-associated heparan sulfate. *J. Immunol.*, 171: 2338-2348.
- Bruno B., Nash R.A., Wallace P.M., Gass M.J., Thompson J., Storb R., McSweeney P.A.; 1999. CD34+ selected bone marrow grafts are radioprotective and establish mixed chimerism in dogs given high dose total body irradiation. *Transplantation*, 68: 338-344.
- Butler J.E., Sun J., Navarro P.; 1996. Swine have a single $J_H < 20 V_H$ genes and IgG in the gut of suckled neonatal piglets. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 2: 53-65.

- Butler J.E.: 1997. Immunoglobulin gene organization and the mechanism of repertoire development. *Scand. J. Immunol.*, 45: 455-462.
- Butler J.E., Weber P., Sinkora M., Baker D., Schoenher A., Mayer B., Francis D.: 2002. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VIII. Colonization is required for newborn piglets to make serum antibodies to dependent and type 2 independent antigens. *J. Immunol.*, 169: 6822-6830.
- Carlyle J.R., Michie A.M., Furlong C., Takano T., Lenardo M.J., Paige C.J., Zuniga-Pflucker J.C.: 1997. Identification of a novel developmental stage marking lineage commitment of progenitory thymocytes. *J. Exp. Med.* 186: 173-182
- Civin C.I. And Gore S.D.: 1993. Antigenic analysis of hamatopoiesis: a review. *J. Hematother.* 2: 137-144
- Chu P.G., Arber D.A. 2001. CD79: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 9(2):97-106. Review
- Cragg M.S., Chan H.T., Fox M.D., Tutt A., Smith A., Oscier D.G., Hamblin T.J., Glennie M.J.: 2002. The alternative transcript of CD79b is overexpressed in B-CLL and inhibits signaling for apoptosis. *Blood.* 100: 3068-3076
- Cukrowska B., Sinkora J., Mandel L., Splichal I., Bianchi A.T., Kováru F., Talskalova-Hogenova H.: 1996. Thymic B cells of pig fetuses and germ-free pigs spontaneously produce IgM, IgG and IgA: detection by ELISPOT method. *Immunology*, 87: 487-492
- Davis S.J., van der Merwe P.A.: 1996. The structure and ligand interactions of CD2: implications for T cell function. *Immunol. Today.* 17: 177-187
- Denham S., Shimizu M., Bianchi A.T.J., Zwart R., Carr M.M., Parkhouse R.M.E. 1994; Monoclonal antibodies recognizing differentiation antigens on porcine B cells. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 43: 259-267
- Denham S., Zwart R.J., Whittall J.T.D., Papmpusch M., Corteyn A.H., Bianchi A.T.J., Murtaugh M.P., Parkhouse R.M.E., Talskalova H., Sinkora J., Sinkora M., Rehakova Z.: 1998. Monoclonal antibodies putatively identifying porcine B cells. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 60: 317-328
- Dewhirst F.E., Chien C., Paster B.J., Ericson R.L., Orcutt R.P., Schauer D.B., Fox J.G.: 1999. Phylogeny of the Defined Murine Microbiota: Altered Shaedler Flora. *Appl. Environ. Microbiol.*, 14: 326-30.
- Dlabač V.: 1980. Report from a meeting of the Committee for standartization of control of germ-free state. *Folia Microbiol.*, 25: 354-358.
- Dvorak P., Dvoraková D., Hruban V., Horak V., Stanek R.: 1986. Monoclonal antibodies specific for pig serum and cell surface IgM.

- Faldyna M., Sinkora J., Knotigova P., Rehakova Z., Moravkova A., Toman M.; 2003. Flow cytometric analysis of bone marrow leucocytes in neonatal dogs. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 95: 165-176.
- Giegerich G.W., Hein W.R., Miyasaka M., Tiefenthaler G., Hunig T.; 1989. Restricted expression of CD2 among subsets of sheep thymocytes and T lymphocytes. *Immunology*, 66: 354-361.
- Hägglund H.G., Mc Sweeney P.A., Mathoudakis G., Bruno B., Georges G.E., Gass M.J., Moore P., Sale G.E., Storb R., Nash R.A.; 2000. Ex vivo expansion of canine dendritic cells from CD34⁺ bone marrow progenitor cells. *Transplantation*, 70: 1437 – 1442.
- Hardy R.R., Li Y.S., Hayakawa K.; 1996. Distinctive developmental origins and specificities of the CD5⁺ B-cell subset. *Immunology*, 8: 37-44
- Harley R., Gruffydd-Jones T.J. and Day M.J.; 2003. Characterization of Immune Cell Populations in Oral Mucosal Tissue of Healthy Adult Cats. *J. Comp. Path.*, 128: 146-155
- Hashimoto Y., Montecino-Rodriguez E., Leathers H., Stephan R.P., Dorshkind K.; 2002. B-cell development in the thymus is limited by inhibitory signals from the thymic microenvironment. *Blood*, 100: 3504 - 3511
- Haverson K., Bailey M., Higgins V.R., Bland P.W., Stokes C.R.; 1994. Characterization of monoclonal antibodies specific for monocytes, macrophages and granulocytes from porcine peripheral blood and mucosal tissues. *J. Immunol. Meth.*, 170: 233-245
- Haverson K., Saalmuller A., et al.; 2001. Overview of the third International Workshop on Swine Leucocyte Differentiation Antigens. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 80: 5-23
- Hontecillas R., Bassaganya-Riera J.; 2003. Differential requirements for proliferation of CD4⁺ and $\gamma\delta$ ⁺ T cells to spirochetal antigens. *Cell. Immunol.*, 224: 38-46.
- Ishihara K., Wood W.J., Jr., Damore M., Hermanson G.G., Wall R. and Kinkade P.W.; 1992. B29 gene products complex with immunoglobulins on B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 89: 633-637.
- Jarošková L., Kovářů F.; 1978. Identification of T and B lymphocytes in pig by combined E-rosette test and surface Ig labeling. *J. Immunol Methods*, 22: 253-261.
- Jiang P., Lagenaur C.F., Narayanan V.; 1999. Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule. *J. of Biol. Chem.*, 274(2): 559-562.
- Jonjic S., Koszinovski U.H.; 1984. Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. I. Antibodies to membrane structures that define cytolytic T lymphocyte subset in swine. *J. Immunol.*, 133: 647-652.
- Jones M., Cordell, J.L., Beyers A.D., Tse A.G.D., Mason D.Y.; 1993. Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *J. Immunol.*, 150: 5429-5435.

- Kaisho T., Schwenk F., Rajewsky K.: 1997. The roles of gamma 1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 responses. *Science*, 276: 412-415.
- Kelleher S.L., Lonnerdal B.: 2001. Immunological activities associated with milk. *Adv. Nutr. Res.*, 10: 39-65
- Kenny E., Mason D., Saoudi A., Pombo A. and Ramirez F.: 2004. CD8 α is an activation marker for a subset of peripheral CD4 T cells. *Eur. J. Immunol.*, 34: 1262-1271.
- Kingma D.W., Imus P., Xie X.Y., Jasper G., Sorbara L., Stewart C., Stetler-Stevenson M.: 2002. CD2 is expressed by a subpopulation of normal B cells and is frequently present in mature B-cell neoplasms. *Cytometry*, 50(2): 243-248.
- Knight A.M., Lucocq J.M., Pescott A.R., Ponnambalam S., Watts C. 1997. Antigen endocytosis and presentation mediated by human membrane IgG1 in the absence of the Ig(alpha)/Ig(beta) dimer. *EMBO J.*, 16(13):3842-50.
- Ko S.Y., Ko H.J., Chang W.S., Park S.H., Kweon M.N., Kang C.Y.: 2005. {alpha}-Galactosylceramide Can Act As a Nasal Vaccine Adjuvant Inducing Protective Immune Responses against Viral Infection and Tumor. *J Immunol.*, 175:3309-17.
- Koyama M., Ishihara K., Karasuyama H., Cordell J.L., Iwamoto A., Nakamura T.: 1997. CD79 α /CD79 β heterodimers are expressed on pro-B cell surfaces without associated μ heavy chain. *Int. Immunol.*, 11: 1767-1772.
- Krejsek J., Kopecky O.: 2004. *Klinická imunologie*. Vydavatelství NUCLEUS.
- Lanning D., Sethupathi P., Rhee K.J., Zhai S.K., Knight K.L.: 2000. Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire. *J. Immunol.* 165: 2012-2019.
- Laurent J., Bosco N., Marche P.N., Ceredig R.: 2004. New insights into the proliferation and differentiation of early mouse thymocytes. *Int. Immunol*, 14.
- Lee J., Choi K., Olin M.R., Cho S.N., Molitor T.W.: 2004. Gammadelta T cells in immunity induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccination. *Infect. Immun.*, 72: 1504-1511.
- Lefkowitz I. (Editor); 1996. *Immunology Methods Manual*, Academic Press, New York
- Li C., Siemasko K., Clark M.R., Song W.: 2002. Cooperative interaction of Ig(alpha) and Ig(beta) of the BCR regulates the kinetics and specificity of antigen targeting. *Int. Immunol.*, 14: 1179-1191.
- Luhtala M., Lassila O., Toivanen P., Vainio O.: 1997. A novel peripheral CD4+CD8+ T cell population: inheritance of CD8alpha expression on CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.*, 27: 189-193.
- Lunney J.K.: 1993. Characterization of swine leucocyte differentiation antigens. *Immunol. Today*, 14: 147-149

- Mabuchi A., Kodaira Y., Norose Y., Saizawa M., Kitajima M. and Yokomuro K.: 1998. Role of the liver in T cell differentiation-generation of CD3-CD4+/CD8+TCR β cells and CD3-4-8-TCR β + cells from CD4-8-TCR β - athymic nude bone marrow cells by culture with parenchymal liver cells. *J. Leukoc. Biol.*, 63: 575-583.
- Mackay C.R., Hein W.R.: 1989. A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int. Immunol.*, 1: 540-545.
- Manz M.G., Traver D., Miyamoto T., Weissman I.L., Akashi K.: 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*, 97: 3333 - 3341
- Mason D.Y., Cordell J.L., Tse A.G.D., van Dongen J.J.M., van Noesel C.J.M., Micklem K.: 1991. The IgM-associated protein mB 1 as a marker of normal and neoplastic B cells. *J. Immunol.*, 147: 2474-2482
- Maybaum T.A. and Reynolds J.D.: 1996. B cells selected for apoptosis in the sheep ileal Peyer's patch have enhanced mutational diversity in the Ig V λ light chain. *J. Immunol.*, 157: 1474-1484.
- McSweeny P.A., Rouleau K.A., Wallace P.M., Bruno B., Andrews R.G., Krizanac-Bengez L., Sandmaier B., Storb R., Wayner E., Nash R.A.: 1998. Characterization of monoclonal antibodies that recognize canine CD34. *Blood*, 91: 1977-1986
- Melchers F., Rolink A., Grawunder U., Winkler T.H., Karasuyama H., Ghia P., Andersson J.: 1995. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr. Opin. Immunol.*, 7: 214-227.
- Miniats O.P., Jol D.: 1973. Gnotobiotic pigs – derivation and rearing. *Canadian J. Comparat. Med.*, 42: 428-437.
- Moingeon P., Chang H.C., Sayre P.H., Clayton L.K., Alcover A., Gardner P., Reinherz E.L.: 1989: The structural biology of CD2. *Immunol. Rev.*, 111: 111-144.
- Moingeon P., Lucich J.L., McConkey D.J., Letourneur F., Malissen B., Kochan J., Chang H.C., Rodewald H.R., Reinherz E.L.: 1992. CD3 zeta dependence of the CD2 pathway of activation in T lymphocytes and natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 89: 1492-1496.
- Moravkova A.: 2001. Diplomová práce: Příprava protilátek proti hlavnímu strukturnímu proteinu myšího polyomaviru.
- Moore M., Metcalf D.: 1970. Ontogeny of the hemopoietic system: Yolk sac origin of in vivo and in vitro colony-forming cells in the developing mouse embryo. *Br. J. Haematol.*, 18: 279-296.
- Muller R., Wienands J., Reth M.: 2000. The serine and threonine residues in the Ig-alpha cytoplasmic tail negatively regulate immunoreceptor tyrosine-based activation motif-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97: 8451-8454

- Muraguchi A., Kawamura N., Hori A., Hori Y., Ichigi Y., Kimoto M., Kishimoto T.: 1992. Expression of CD2 molecule on human B lymphoid progenitors. *Int. Immunol.*, 4: 841-849
- Namen A.E., Lupton S., Hjerrild K., Wignall J., Mochizuki D.Y., Shmierer A., Mosley B., March C.J., Urdal D., Gillis S.: 1988. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature*. 333: 571-3.
- Neuner E., Shumm M., Schneider E.M., Guenther W., Ellwart J., Kremmer E., Vogl C., Buettner M., Thierfelder S., Kolb H.J.: 1997. Immune phenotype of canine progenitor cells. *Tiss. Antigens*, 50: 466-474
- Niemeyer G.P., Hudson J., Bridgman R., Spano J., Nash R.A., Lonthrop C.D.: 2001. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.*, 29: 686-693.
- Okazaki M., Luo Y., Han T., Yoshida M. and Seon B.K.: 1993. Three new monoclonal antibodies that define a unique antigen associated with prolymphocytic leukemia/non Hodgkin's lymphoma and are effectively internalized after binding to the cell surface antigen. *Blood*, 81: 84-94.
- Osawa M., Hanada K., Hamada H. and Nakauchi H.: 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273: 242-245
- Osmond D.G.: 1993. The turnover of B-cell populations. *Immunol. Today*, 14: 34-37
- Otero D.C., Rickert R.C.: 2003. CD19 function in early and late B cell development. II. CD19 facilitates the pro-B/pre-B transition. *J. Immunol.*, 171: 5921-5930
- Pelanda R., Braun U., Hobeika E., Nussenzweig M.: 2002. B cell progenitors are arrested in maturation but have intact VDJ recombination in the absence of Ig-alpha and Ig-beta. *J. Immunol.*, 169: 865-72.
- Poupot M., Fournie J.J.: 2004. Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *Immunol. Lett.*, 95: 129 – 138.
- Prendergast M.M., Bradstock K.F., Broomhead A.F., Hughes W.G., Karbal A., Berdt M.C., Tiver K.: 1986. Monoclonal antibody analysis of canine hemopoietic cells. Role of Ia-like and Thy-1 antigens in bone marrow engraftment. *Transplantation*, 41: 565-571
- Press C.M., McCullagh P., Landsverk T.: 2001. Effect of early fetal splenectomy on prenatal B-cell development in sheep. *Immunology*, 102: 131-136.
- Rolink A., Melchers E.: 1993. Generation and regeneration of cells of the B-lymphocyte lineage. *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 207-217
- Rossi M.I., Yokota T., Medina K.L., Garrett K.P., Comp P.C., Schipul A.H. Jr, Kincade P.W.: 2003. B lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes. *Blood*, 10: 576-84

Rushworth S.A., Bravery C.A., Thompson S.; 2000. High sequence homology between human and pig CD40 with conserved binding to human CD154. *Transplantation*, 69: 936-940

Saalmuller A., Reddehase M.J., Buhring H.-J., Jonjic S., Koszinowski U.H.; 1987. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T-lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 17: 1297-1301

Saalmuller A.; 1996. Characterization of swine leucocyte differentiation antigens. *Immunol. Today*, 7: 352-354

Saalmuller A., Werner T., Fachinger V.; 2002. T-helper cells from naive to committed. *Vet. Immun. Immunopathol.* 87, 137 – 145

Salzman N.H., de Jong H., Paterson Y., Harmsen H.J., Welling G.W., Bos N.A.; 2002. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology*, 65: 3287-3292.

Sanchez M.J., Holmes A., Miles C., Dzierzak E.; 1996. Characterization of the first definitive hematopoietic stem cell in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* 5: 513-525

Sarma-Rupavtarm R.B., Ge Z., Schauer D.B., Fox J.G., Polz M.F.; 2004. Spatial distribution and stability of the eight microbial species of the altered schaedler flora in the mouse gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2791-2800.

Sanz E., Alvarez-Mon M., Martinez A.C., de la Hera A.; 2003. Human cord blood CD34+Pax-5+ B-cell progenitors: single cell analyses of their gene expression profiles. *Blood*, 101(9): 3424-3430.

Sato S., Tedder T.F. 1997. CD19 workshop panel report. In: Kishimoto T., Kikutani H., von dem Borne A.E.G, Goyert S.M., Mason D.Y., Miyasaka M., et al., editors. *Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan.* New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 133-5.

Schondelmaier S., Wesch D., Pechhold K., Kabelitz D.; 1993. V gamma gene usage in peripheral blood gamma delta T cells. *Immunol. Lett.*, 38: 121-126.

Sen J., Arceci R.J., Jones W., Burakoff S.J.; 1989. Expression and ontogeny of murine CD2. *Eur. J. Immunol.*, 19: 1297-1302.

Sen J., Rosenberg N., Burakoff S.J.; 1990. Expression and ontogeny of CD2 on murine B cells. *J. Immunol.*, 144: 2925-2930.

Sinkora J., Rehakova Z., Sinkora M., Cukrowska B., Tlaskalova-Hogenova H., Bianchi A.T., De Geus B.; 1998. Expression of CD2 on porcine B lymphocytes. *Immunology*, 95(3): 443-449.

Sinkora J., Rehakova Z., Samankova L., Haverson K., Butler J.E., Zwart E., Boersma W.; 2001. Characterization of monoclonal antibodies recognizing immunoglobulin kappa and lambda chains in pigs by flow cytometry. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 80: 79–91.

- Sinkora J., Rehakova Z., Sinkora M., Cukrowska B. and Tlaskalova-Hogenova H.; 2002. Early development of immune system in pigs. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 87: 301-306
- Sinkora M., Sun J., Sinkorova J., Christenson R.K., Ford S.P., Butler J.E.; 2003. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VI. B cell lymphogenesis occurs at multiple sites with differences in the frequency of in frame rearrangements. *J. Immunol.*, 170: 1781-1788.
- Smyth M.J., Wallace M.E., Nutt S.L., Yagita H., Godfrey D.I., Haykawa Y.; 2005. Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer. *J Exp Med.*, 201: 1973-85.
- Spruyt L.L., Glennie M.J., Beyers A.D., Williams A.F.; 1991. Signal transduction by the CD2 antigen in T cells and natural killer cells: requirement for expression of a functional T cell receptor or binding of antibody Fc to the Fc receptor, Fc gamma RIIIA (CD16). *J. Exp. Med.*, 174: 1407 – 1415.
- Sterzl J., Silverstein A.M.; 1967. Developmental aspects of immunity. *Adv. Immunol.*, 6: 337-371.
- Sterzl J. 1993. Imunitní systém a jeho fyziologické funkce. Česká imunologická společnost, Praha
- Summerfield A. and McCullough K.C.; 1997. Porcine bone marrow myeloid cells: phenotype and adhesion molecule expression. *J. Leuk. Biol.*, 62: 176-185.
- Summerfield A., Haverson K., Thacker E., McCullough K.C.; 2001a. Differentiation of porcine myeloid bone marrow haematopoietic cell populations. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 80: 121-129
- Summerfield A., Zingle K., Inumari S., McCullough K.C.; 2001b. Induction of apoptosis in bone marrow neutrophil-lineage cells by classical swine fever virus. *J. Gen. Virol.*, 82: 1309-1318
- Summerfield A., Horn M.P., Lozano G., Carrasco C.P., Atze K., McCullough K.; 2003. C-kit positive porcine bone marrow progenitor cells identified and enriched using recombinant stem cell factor. *J. Immunol. Meth.*, 280: 113-123
- Sun J., Butler J.E.; 1996. Molecular characterization of VDJ transcripts from a newborn piglet. *Immunology*, 88: 331-339.
- Sun J., Sinkora J., Wertz N., Moravkova A., Butler J.E.; 2004. Characterization of porcine CD19 and anti-CD19 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.*, 41: 929-38.
- Takamatsu H.H., Denyer M.S., Wileman T.E. 2002. A sub-population of circulating porcine gamma delta T cells can act as professional antigen presenting cells. *Vet Immunol Immunopathol.*; 87(3-4):223-4.

- Tamauchi H., Tamaoki N. and Habu S.: 1988. CD4+CD8+ thymocytes develop into CD4 or CD8 single-positive cells in athymic nude mouse. *Eur. J. Immunol.*, 18: 1859-1862.
- Tizard I.: 2001. The protective properties of milk and colostrum in non-human species. *Adv. Nutr. Res.*, 10: 139-166.
- Trávníček J., Mandel L., Lanc A., Růžička R.: 1966. Odchov bezmikrobních selat. *Čsl. Fysiologie*, 15: 240-244.
- Van der Merwe P.A., Davis S.J.; 2003. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 21: 659-684.
- Venkitaraman A.R., Williams G.T., Dariavach P. and Neuberger M.S.; 1991. The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature*, 352: 777-781
- Weill J.C. and Reynaud C.A.; 1998. Galt versus bone marrow models of B cell ontogeny. *Develop. Compar. Immunol.*, 22: 379-385
- Visser J.W.M. and Van Bekkum D.W.; 1990. Purification of pluripotent hemopoietic stem cells: past and present. *Exp. Hematol.* 18: 248-256
- Yamaguchi M., McSweeney P.A., Kimball L., Gersuk G., Hong D.S., Kwok W., Storb R., Beckham C., Deeg H.J.; 1999. Recognition of major histocompatibility complex class II antigens by two anti-HLA-DR monoclonal antibodies on canine marrow cells correlates with effects on in vitro and in vivo hematopoiesis. *Transplantation*, 68: 1161-1171.
- Yamanaka T., Helgeland L., Farstad I.N., Fukushima H., Midtvedt T., Brandtzaeg P.; 2003. Microbial Colonization Drives Lymphocyte Accumulation and Differentiation in the Follicle-Associated Epithelium of Peyer's Patches. *J. Immunol.*, 170: 816-822
- Yang H., Parkhouse R.M.; 1996. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology*, 92: 45-52
- Yang H., Parkhouse R.M.; 1997. Differential expression of CD8 epitopes amongst porcine CD8-positive functional lymphocyte subsets. *Immunology*, 92: 45-52.
- Yang H., Parkhouse R.M.; 2000. Characterization of the porcine gammadelta T-cell receptor structure and cellular distribution by monoclonal antibody PPT27. *Immunology*, 99: 504-509.
- Zuckermann F.A., Gaskins H. R.; 1996. Distribution of porcine CD4/CD8 double-positive T-lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues. *Immunology*, 87: 493-499.
- Zuckermann F.A.; 1999. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet. Immun. Immunopathol.* 72: 55-66
- Zuckermann F.A., Schnitzlein W.M., Thacker E., Sinkora J., Haverson K.; 2001. Characterization of monoclonal antibodies assigned to the CD45 subgroup of the Third International Swine CD Workshop. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 80: 165-174.



Flow cytometric analysis of bone marrow leukocytes in neonatal dogs

Martin Faldyna^{a,1}, Jiri Sinkora^{b,1}, Pavlina Knotigova^a, Zuzana Rehakova^b,
Alena Moravkova^b, Miroslav Toman^{a,*}

^a*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

^b*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Nový Hrádek, Czech Republic*

Received 14 October 2002; received in revised form 8 May 2003; accepted 29 May 2003

Abstract

Dogs represent both an important veterinary species and a convenient model for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Even though anti-canine CD34 antibodies have recently become available, little is known about hematopoietic lineages in dogs, partially because CD34⁺ cells have been ignored in all analyses performed so far. In this study, we have focused on the bone marrow mononuclear compartment to provide an additional piece of information on the phenotype of CD34⁺ progenitors and to identify the dominant CD34⁺ population. We have shown that, in contrast to the adults, mature lymphocytes are scarce in neonatal dog bone marrow. Using cross-reactive antibodies against CD79 α we have shown that the B lineage of hematopoiesis strongly prevails. CD34⁺ cells were shown to be positive for MHC class II and SWC3, a member of the signal regulatory protein family.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: CD34; SIRP; B cell; Hematopoiesis

1. Introduction

Dogs are an important veterinary species and have been used as a model in the field of autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (Ladjiges et al., 1990; Wagner and Storb, 1996). Complex studies on canine hematopoiesis, however, are infrequent and suffer from limitations that are common for large animal models—a restricted panel of specific reagents are available and insufficient information on

the phenotype of hematopoietic progenitors, lineage committed precursors and successive differentiation stages of individual hematopoietic lineages has thus been published. Almost 20 years ago, Klein et al. (1983) were the first who quantified the colony forming capacity in fetal and neonatal dogs. The results of their study indicated that, similar to other species, fetal liver and bone marrow represent successive primary blood-forming centers in early canine ontogeny.

In all mammalian species studied so far, the expression of MHC class II antigens has been documented on the earliest hematopoietic progenitors. In dogs, however, this issue has not been completely solved yet. Neuner et al. (1997) have described a variable expression of class II on putative early progenitors.

* Corresponding author. Tel.: +420-541-321-241;
fax: +420-541-211-229.

E-mail address: toman@vri.cz (M. Toman).

¹ Both authors contributed equally to the work.

On the other hand, Prendergast et al. (1986) suggested that class II antigens are present on more mature cells only, while HSC are class II-negative. In contrast to this, other groups were capable of accomplishing complete engraftment upon transplantation of class II-positive cells separated by immunoabsorption (Berenson et al., 1987) and flow sorting (Schuening et al., 1987). Such conflicting data may be explained by the finding of Yamaguchi et al. (1999), who have shown class II presence on the surface of early progenitor cells but its visualization was dependent upon mAb used. Similar to MHC class II, some disagreement exists in the expression of another early hematopoietic marker—Thy-1—on HSC in dogs. In contrast to Hahn et al. (1991), who described the absence of Thy-1 on the surface of canine HSC, Neuner et al. (1997) used a different anti-Thy-1 mAb and identified low expression of Thy-1 on the surface of canine pluripotent hematopoietic cells. This was in an agreement with earlier data reporting about Thy-1 expression on early hematopoietic stages (Prendergast et al., 1986).

Immunoreagents specific for CD34 represent one of the most powerful tools for visualizing and sorting hematopoietic progenitors. In dogs, CD34 cDNA has been cloned, sequenced and expressed, polyclonal antiserum specific for recombinant CD34 has been prepared (McSweeney et al., 1996) and mAb directed against CD34 have recently become available (McSweeney et al., 1998). This made it possible to isolate CD34⁺ cells from BM and use them for reconstitution of hematopoiesis in irradiated animals (Bruno et al., 1999). Recently, magnetic depletion of mature leukocyte populations from adult bone marrow mononuclear cell (BMMC) preparations by a cocktail of mAb directed against CD5, CD8, CD14 and, as yet poorly defined surface markers expressed on granulocytes, B cells and platelets, has been shown to provide partial enrichment for both CFU-GM and early progenitors defined by surface expression of CD34 and/or c-kit (Niemeyer et al., 2001). This approach, however, suffers from several limitations as both numerous B cell precursors and nucleated stages of erythropoiesis would not be depleted by the cocktail of mAb used; such cells would then represent significant contamination in BM hematopoietic cell preparations. Immunophenotyping of canine BMMC has revealed that, similar to other species, both CD34/c-kit and CD34/Flt-3-ligand double positive (DP) cells exist in dogs (Niemeyer et al., 2001).

It is thus reasonable to hypothesize that the earliest progenitors of hematopoiesis in this species will reside in the CD34⁺c-kit⁺Flt-3-ligand⁺ fraction.

In our work we focused on characterizing major subsets of the BMMC compartment in neonatal dogs. We have used an efficient isolation technique with a high enrichment capacity for CD45⁺ cells and immunophenotyped leukocytes with a panel of selected immunoreagents. In addition to well-defined differentiation markers we have studied the expression of a putative hematopoietic marker, an SIRP-like molecule SWC3 recognized by mAb with broad interspecies cross-reactivity. The results obtained in neonatal puppies have been compared with and found different from the situation in adult dogs in a limited series of experiments.

2. Materials and methods

2.1. Animals, tissue collection and cell isolation

Eighteen pups—eight, four, four and two at the age of 1 day, 1 week, 2 weeks, and 1 month, respectively—and three adult dogs were sacrificed under general anesthesia by complete bleeding using cardiac puncture. Newborn pups of different breeds were from super-numerary litters from private owners and older Beagle-pups were from the Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic, and were euthanized under agreement of the Branch Commission for Animal Welfare of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. Adult dogs (Beagles) were sacrificed because of orthopedic or cardiac disorders.

Bone marrow cells were flushed with phosphate-buffered saline (PBS) from the femur by positive pressure using a syringe with a needle. Hypotonic shock-resistant cells were obtained as described elsewhere (Sinkora et al., 1998). Shortly, a gently resuspended cell pellet was exposed to distilled water for 30 s and the osmotic pressure was then reconstituted with an equal volume of 2× concentrated PBS. This procedure yields more than 99% leukocyte (CD45⁺) purity in all mammalian species tested, including dogs. Alternatively, ammonium chloride-mediated hemolysis was performed for 10 min using a lysing solution containing 8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ and 1 mM EDTA per liter of distilled water. After hypotonic or

ammonium chloride-mediated lysis, the cells were washed twice in washing and staining buffer (WSB, PBS containing 0.2% gelatin from cold water fish skin, 0.1% sodium azide and 0.05 mM EDTA, all reagents from Sigma). Peripheral blood leukocytes (PBL) were obtained from heparinized blood using the same isolation protocol. It is important to emphasize that at least a 25-fold excess of distilled water must have been added to the heparinized blood to achieve complete erythroid cell removal. Before staining, the cells were counted and their density was set to $(0.5-1) \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$.

2.2. Immunostaining

Cell suspensions were stained using a panel of monoclonal antibodies (mAb) directed against antigens expressed on the surface of canine leukocytes (Table 1). Besides dog-specific immunoreagents, three mAb with broad interspecies cross-reactivity were used: the anti-CD79 α mAb HM57 (Jones et al., 1993), anti-SWC3 mAb DH59B (Davis et al., 1987) and anti-IgM mAb CM7 (Lunn et al., 1998).

Indirect immunofluorescence was used for single color flow cytometry. The cells were incubated with mouse monoclonal antibodies, washed twice in WSB and Fc-receptor-mediated binding was blocked by adding heat-inactivated (h.i.) non-immune goat serum

(final concentration of 10%) to WSB during the second washing step. The binding of primary immunoreagents was visualized with FITC-conjugated, mouse subisotype-specific goat antisera (Southern Biotechnology Associates) as described elsewhere (Faldyna et al., 2001). After three additional washings in WSB the cells were ready for flow cytometry.

For counterstaining with R-phycoerythrin (R-PE) conjugated primary antibodies (anti-CD34, cat. No. 07121A, BD PharMingen), and anti-CD79 α (cat. No. M7051, DAKO), a modified protocol was used. Cell surfaces were indirectly stained with an unconjugated mAb as described above. During the last washing step 10% h.i. mouse serum was added to WSB to block free binding sites on secondary antisera. For CD34 staining, the cells were then incubated with 0.2 μg of R-PE-conjugated anti-CD34 mAb for 30 min, washed and used for flow cytometry. Anti-CD79 α mAb HM57 recognizes an intracellular epitope on a surface-bound protein (Jones et al., 1993). Thus, the cells must have been fixed and permeabilized before staining using a fixation/permeabilization IntrastainTM kit (DAKO) according to the manufacturer instructions.

2.3. Flow cytometric analysis

Data were acquired on a standard FACSCaliburTM flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View,

Table 1
Mouse monoclonal antibodies (mAb) used in the study

mAb	Specificity	Isotype	Distribution	Source
CA17.2A12	caCD3	IgG1	T cells	P.F. Moore ^a
CA13.1E4	caCD4	IgG1	Helper T cell subset	P.F. Moore
CA9.JD3	caCD8	IgG2a	Subsets of T and NK cells	P.F. Moore
CA2.1D6	caCD21	IgG1	B cell lineage	P.F. Moore
CA20.8H1	caTCR $\gamma\delta$	IgG2a	$\gamma\delta$ T cells	P.F. Moore
CA12.10C12	caCD45	IgG1	All leukocytes	P.F. Moore
CA4.1D3	caCD45RA	IgG1	B cells, T cell subset	P.F. Moore
CA1.4G8	caThy-1	IgG1	Thymic stromal cells, progenitors	P.F. Moore
CA2.1C12	caMHC-II	IgG1	Antigen-presenting cells	P.F. Moore
IH6 ^b	caCD34	IgG1	Progenitor cells	BD PharMingen
CM7	IgM	IgG1	B cell lineage	Serotec Ltd.
HM57 ^c	CD79 α	IgG1	B cell lineage	DAKO Diag.
DH59B	SWC3 ^c	IgG1	Phagocytes, progenitors	VMRD, Inc.

^a School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA.

^b R-PE-conjugated, the other mAbs used non-conjugated.

^c SWC3--Swine Workshop Cluster 3, a member of Signal Immunoregulatory Protein-like family monoclonal antibodies CM7, HM57, DH59B have been raised against other species and shown to react with canine homologues of surface molecules.

CA) operated by the CELLQuest™ software. In each sample, 10,000–50,000 cells were measured and the data were saved in the list mode. Electronic compensation was used to eliminate spectral overlaps between fluorochromes. In non-fixed samples, propidium iodide was used to stain DNA in dead and damaged cells and to exclude these events from analysis. The WinMDI™ or PC-lys™ software was used for data analyses.

2.4. Statistical analysis

Because a relatively small variance of experimental data has been obtained for individual parameters measured in different animals, symmetric Gaussian distribution was used as an appropriate approximation for statistical analysis. Data are thus expressed as mean values \pm S.D.. The differences between relative proportions of leukocyte subpopulations in bone marrow and peripheral blood were evaluated using the paired Student's *t*-test. All calculations were performed with Prizma™ (Graph Pad Software, Inc.) software.

3. Results

3.1. Major populations of bone marrow leukocytes in dogs

Neonatal dog BM cells that can sustain short exposure to low osmotic pressure, thus called hypotonic shock-resistant cells (HS-RC), were classified both by

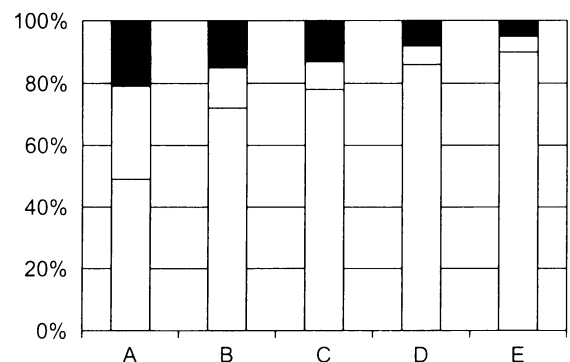


Fig. 2. Relative proportions of bone marrow granulocytes (gray) and small (white) and large (black) mononuclear cells as defined by light scatter characteristics in newborn (A), 1-week-old (B), 2-week-old (C), and 1-month-old (D) and adult dogs (E), respectively. Mean values are shown; differences between individual samples did not exceed 3%.

light scatter characteristics and surface expression of markers commonly used for leukocyte analysis in dogs and other mammalian species. Based on excitation beam scattering, dog HS-RC can be divided into three major populations (Fig. 1). Granulocytes (polymorphonuclear cells) form a distinguishable population with higher SSC values. Mononuclear cells, on the other hand, map to the low SSC region in the FSC/SSC dot plot and can be further subdivided into two subsets based on the FSC parameter—small and large mononuclears with low and high FSC value, respectively. The relative proportions of major HS-RC populations during postnatal ontogeny are shown in Fig. 2. Age-dependent changes, i.e. an increase in number of granulocytes and a decrease in numbers of both small and

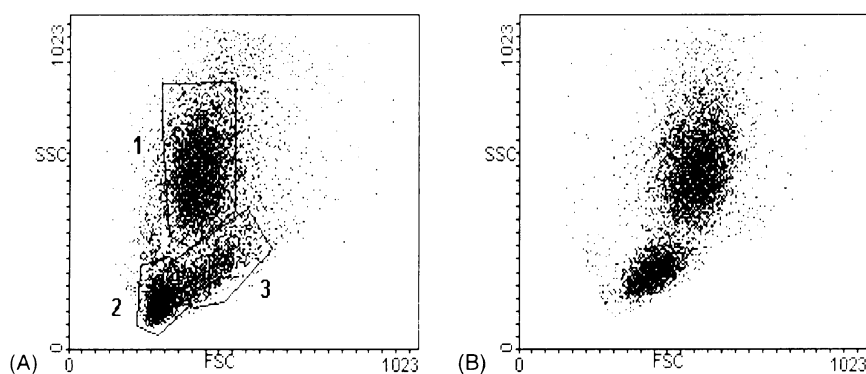


Fig. 1. Light scatter characteristics of hypotonic shock-resistant cells in bone marrow (A) and peripheral blood (B). In the bone marrow, granulocytes (1), small (2) and large (3) mononuclear cells are distinguishable.

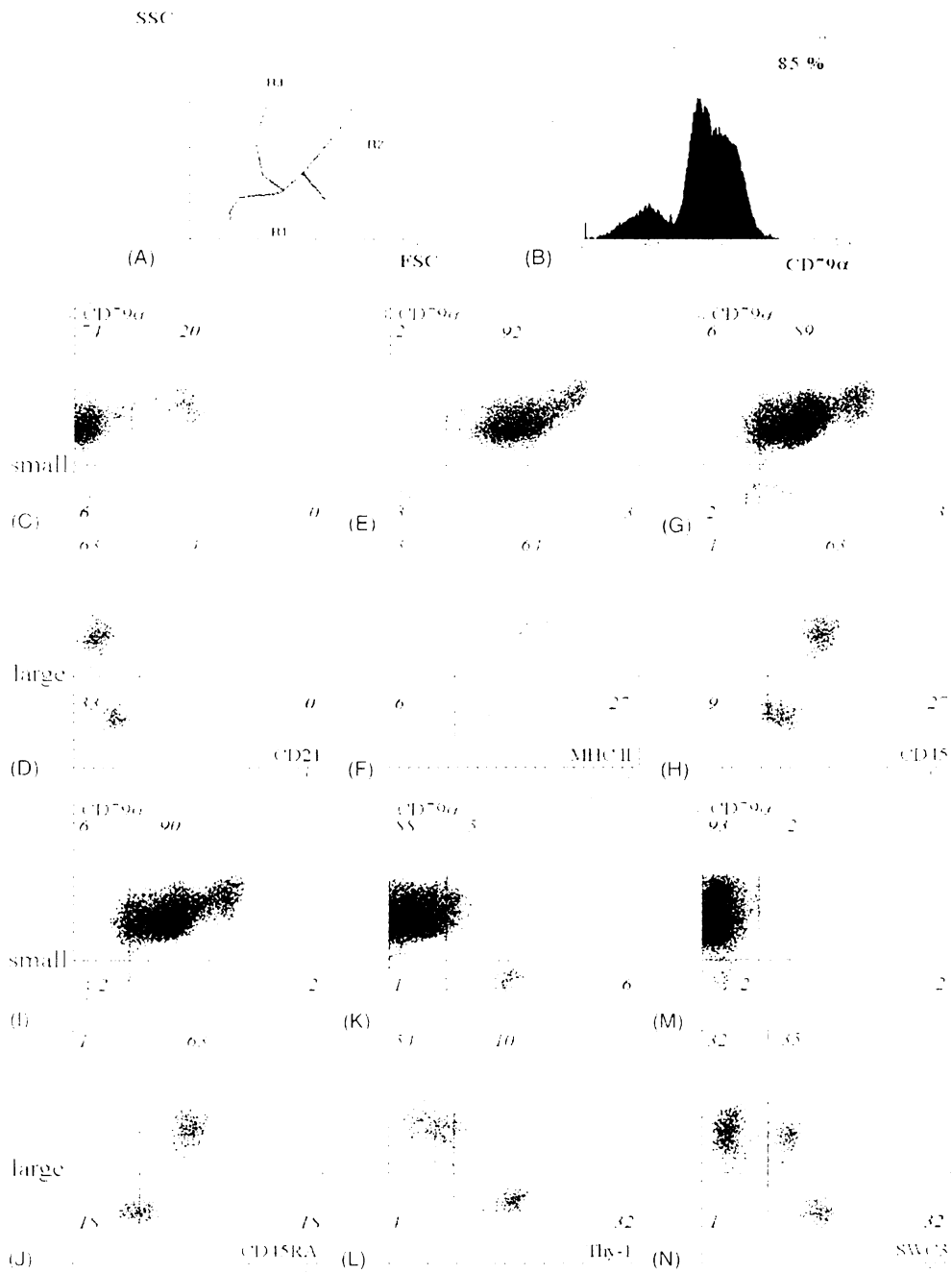


Fig. 6. Co-expression of CD79 α and other surface markers in the neonatal dog BM HS-RC. In the DAKO IntrastainTM fixed and permeabilized cells, granulocytes, small mononuclear cells and large mononuclear cells can be distinguished in the FSC/SSC dot plot (R3, R1 and R2 in (A), respectively). A great majority of mononuclear HS-RC (R1 + R2 in (A)) bear CD79 α on the surface (B). Co-expression of CD79 α and CD21 (C) and (D), MHC class II (E) and (F), CD45 (G) and (H), CD45RA (I) and (J), Thy-1 (K) and (L) and SWC3 (M) and (N) is demonstrated. Small ((C), (E), (G), (I), (K), (M)) and large ((D), (F), (H), (J), (L), (N)) mononuclear HS-RC were analyzed separately.

lineage appear virtually SWC3-negative (Fig. 6M), a clearly recognizable CD79 α /SWC3 DP population is present among large mononuclear HS-RC (Fig. 6N). In all samples examined, CD79 α ⁺SWC3⁺ cells included 30–40% of large mononuclear HS-RC. For the gating strategy used, the typical small-to-large mononuclear HS-RC ratio is 10:1. Therefore, the CD79 α /SWC3 DP population involved 3–5% of mononuclear leukocytes isolated by hypotonic shock from neonatal dog BM.

4. Discussion

In this study, we characterized BM HS-RC in newborn pups and compared them with cells isolated from older pups and adult dogs. Using multiparameter flow cytometry, we have determined the expression of selected lineage-specific as well as early hematopoietic markers. Using light scatter characteristics we distinguished granulocytes and mononuclear cells, the latter could be further subdivided into the large and small cell compartments, respectively. Gating for small and large mononuclear subsets is convenient for multiparameter analysis of hematopoiesis in primary sites (fetal liver, bone marrow, thymus) where high numbers of cycling, thus large cells are present. In BM, we have revealed changes in relative numbers of three major HS-RC populations with an increasing proportion of granulocytes in older individuals. This finding is in a good agreement with the situation in the peripheral blood, where a higher percentage of granulocytes have been documented in adult dogs when compared to pups (Faldyna and Toman, 1998; Faldyna et al., 2001) and may reflect an elevated granulocyte forming capacity and/or a decreased primary lymphopoietic activity with increasing age. The expression of CD4 on dog granulocytes in both peripheral blood and BM, probably associated with granulocyte maturation, was originally described by Moore et al. (1992). The unusual binding profile of mouse IgG2a to dog BM granulocytes has not been described yet neither was such a phenomenon reported in other species. As BM contains all stages of phagocyte differentiation, such reactivity appears both developmentally regulated and highly specific. It could be blocked with dog and mouse serum, although heterologous serum appeared less effective, which suggests an important role of

unsaturated or transitionally expressed Fc γ receptor. In dogs, more attention must be paid to mAb selection in BM cell studies.

In neonatal BM, relatively few T (CD3⁺), NK (CD3⁺CD8⁺) and mature B (CD21⁺) were present. With increasing age BM plays a dual role of both the primary site and the secondary lymphatic organ maintaining a pool of effector (Manz et al., 2002) and memory (Price and Cerny, 1999) lymphocytes. This results in a relative decrease of hematopoietic progenitor frequency in BM cell preparations and makes the analysis of the BM lymphoid compartment more complicated. First BM T cells with mature (CD3⁺) phenotype appeared between the second and fourth week of life and their numbers reached more than 60% in the BM lymphoid compartment in adult dogs. In parallel, the frequency of CD34⁺ progenitors decreased from 3 to 9% in neonates to about 1% in adult dogs. Other studies (McSweeney et al., 1996, 1998; Bruno et al., 1999; Hägglund et al., 2000) describe 1–3% of CD34⁺ cells in adult dogs, which is in good agreement with our data when differences in isolation techniques are taken into account.

Dog CD34⁺ progenitors have been previously described to consist of both small and large mononuclear cells (McSweeney et al., 1998; Bruno et al., 1999). To our surprise, all CD34⁺ HS-RC in our samples had higher FSC values than typical lymphocytes and our conclusion was that the complete progenitor population is contained in the large HS-RC. As ammonium chloride-treated BM samples in a control experiment contained both small and large CD34⁺ cells, which were CD45⁺ and class II-negative, we prefer the hypothesis that small CD34⁺ elements belong to the erythroid lineage of hematopoiesis.

The DH59B mAb recognizes a surface structure expressed on peripheral phagocytes in different species (Nagi and Babiuk, 1989; Blecha et al., 1994; Tumas et al., 1994; Smith et al., 1992) and it has been clustered to the Swine Workshop Cluster 3 (SWC3) during the First International Swine Cluster of Differentiation Workshop (Haverson et al., 1994). SWC3 antigen has recently been characterized by N-terminal amino acid sequencing and shown to be homologous to members of the SIRP (signal regulatory protein) family (Alvarez et al., 2000). In contrast to conclusions made almost 10 years ago, SWC3 expression is not restricted to the myelomonocytic lineage of

hematopoiesis in pigs; also dendritic cells (Carrasco et al., 2001) and a subset of undifferentiated Peyer's patch B cells (Andersen et al., 1999) have been shown to be SWC3-positive. Important for our study, DH59B cross-reacts with canine leukocytes, too, and the expression profile in the periphery perfectly fits that in other species (Davis et al., 1987; Faldyna et al., 2001). Counter-staining of HS-RC with anti-CD34 and DH59B have revealed that all CD34⁺ HS-RC express SWC3 at low density. Our data correspond to recently published observations of the occurrence of SIRP-1 α (CD172) on human bone marrow progenitor cells (Seiffert et al., 1999). Due to its broad cross-reactivity, DH59B might become a useful tool for studying hematopoietic cells in primary sites in animal models in which no anti-CD34 immunoreagents have become available yet.

The expression on MHC class-II on hematopoietic progenitors in dogs has been a controversial issue, although the majority of authors have concluded that non-committed canine progenitors are class II-positive. Our results support this assumption because essentially no CD34⁺ class II⁺ could be detected in HS-RC preparations.

Staining with the anti-CD79 α mAb has shown that more than 80% of mononuclear HS-RC were CD79 α ⁺. The CD79 α antigen (also called mb-1 or Ig α) is an essential component of the B cell receptor complex. In humans and mice, it is expressed early during B cell development, specifically at the pro-B level and can be detected at all subsequent stages of B cell development. The anti-CD79 α antibody HM57 used in our study had been obtained by immunizing mice with the synthetic peptide GTYQDVGSLNIADVQ corresponding to an intracellular portion of the antigen. HM57 has been reported to be cross-reactive with B cells in many species including man, monkey, pig, horse, rabbit, cow, guinea pig, rat, mouse, and opossum (Jones et al., 1993). We have successfully tested its convenience in dogs and shown that the staining profile corresponds to a B lineage-restricted marker. Simultaneous staining of neonatal HS-RC with HM57 and the panel of selected mAb has provided important information on B cell differentiation in dogs. First of all, neonatal dog bone marrow is literally filled with differentiating precursors belonging to the B lineage of hematopoiesis; other lymphoid elements must thus be relatively rare. Both small and

large CD79 α ⁺ cells could be found in the mononuclear compartment representing resting and cycling stages of B lymphogenesis as proved in other species. Small CD79 α ⁺ cells can be further subdivided into two major subsets with different levels of CD21 expression. As CD21 upregulation is accompanied by a slight increase of the cell volume we speculate that the smallest CD21^{lo} cells are canine small pre-B II cells rearranging the variable regions of genes encoding immunoglobulin light chains and the increase of CD21 expression accompanies the last differentiation step into the stage of immature CD21⁺ B cells. Vigorously cycling large B precursors with rearranged Ig heavy chain genes are called large pre-B II cells in mice and humans. The population of large CD79 α ⁺ HS-RC in pups consists from at least two subsets differing in SWC3 (CD172) expression. As CD172 represents an early hematopoietic marker and because late stages of B lymphopoiesis are SWC3⁺ we suggest that large SWC3⁺ CD79 α ⁺ cells are the earliest B precursors identifiable by our tools, while the SWC3⁺ CD79 α ⁺ population of large HS-RC represents their immediate progeny. Based on our assumptions we suggest the following scheme for B lineage development in dogs: pro-B/pre-BI cells are FSC^{hi}CD79 α ⁺SWC3⁺CD21⁺CD45^{lo} and the rearrangement of Ig heavy chain genes, the first definitive step of B lineage commitment, is accompanied by the disappearance of SWC3 from the cell surface. Large pre-B II cells are thus FSC^{hi}CD79 α ⁺SWC3⁺CD21⁺CD45^{lo}. The next differentiation stage—small pre-B II cells—are the smallest HS-RC as defined by FSC and their surface phenotype is CD79 α ⁺SWC3⁺CD21⁺CD45^{lo}. Small pre-B II cells are followed by immature B cells that are slightly larger and acquire the FSC^{med}CD79 α ⁺SWC3⁺CD21⁺CD45^{hi} characteristics. MHC class II is present on all B precursors and its expression increases with differentiation.

The presence of the Thy-1 antigen (CD90) has been described on murine and human hematopoietic progenitors. Its surface expression is typically low and disappears upon lineage commitment (Miller et al., 1985; Spangrude, 1989; Craig et al., 1993). We have observed a small subset of CD34⁺Thy-1⁺DP cell in the mononuclear HS-RC compartment. Whether or not these cells are hematopoietic stem cells must be tested by cell sorting and reconstitution experiments in irradiated recipients.

Acknowledgements

The work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant Nos. 524/00/0474 and 524/02/P010A).

References

- Alvarez, B., Sánchez, C., Bullido, R., Marina, A., Lunney, J., Alonzo, F., Ezquerro, A., Dominguez, J., 2000. A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associated with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Tiss. Antigens* 55, 342–351.
- Andersen, J.K., Takamatsu, H., Pullen, L., Parkhouse, R.M., 1999. Systematic characterization of porcine ileal Peyer's patch. II. A role for CD154 on T cells in the positive selection of immature porcine ileal Peyer's patch B cells. *Immunology* 98, 622–629.
- Berenson, R.J., Bensinger, W.L., Kalamasz, D., Schuening, F., Deeg, H.J., Graham, T., Storb, R., 1987. Engraftment of dogs with Ia-positive marrow cells isolated by avidin-biotin immunoadsorption. *Blood* 69, 1363–1367.
- Blecha, F., Kielian, T., McVey, D.S., Lunney, J.K., Walker, K., Stokes, C.R., Stevens, K., Kim, Y.B., Chu, R.M., Chen, T.S., Murtaugh, M.P., Choi, C., Molitor, T.W., McCullough, K.C., Pescovitz, M.D., 1994. Workshop studies on monoclonal antibodies reactive against porcine myeloid cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 269–272.
- Bruno, B., Nash, R.A., Wallace, P.M., Gass, M.J., Thompson, J., Storb, R., McSweeney, P.A., 1999. CD34⁺ selected bone marrow grafts are radioprotective and establish mixed chimerism in dogs given high dose total body irradiation. *Transplantation* 68, 338–344.
- Carrasco, C.P., Rigden, R.C., Schaffner, R., Gerber, H., Neuhaus, V., Inumaru, S., Takamatsu, H., Bertoni, G., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2001. Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology* 104, 175–184.
- Craig, W., Kay, R., Cutler, R.L., Lansdorf, P.M., 1993. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 177, 1331–1342.
- Davis, W.C., Marusic, S., Lewin, H.A., Splitter, G.A., Perryman, L.E., McGuire, T.C., Gorham, J.R., 1987. The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15, 337–376.
- Faldyna, M., Toman, M., 1998. The effect of age on the distribution of lymphocyte and neutrophil granulocyte subsets in the peripheral blood of dog. *Vet. Med. Czech.* 43, 193–199.
- Faldyna, M., Leva, L., Knotigova, P., Toman, M., 2001. Lymphocyte subsets in the peripheral blood of dogs—flow cytometry detection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 82, 23–37.
- Hägglund, H.G., McSweeney, P.A., Mathioudakis, G., Bruno, B., Georges, G.E., Gass, M.J., Moore, P., Sale, G.E., Storb, R., Nash, R.A., 2000. Ex vivo expansion of canine dendritic cells from CD34⁺ bone marrow progenitor cells. *Transplantation* 70, 1437–1442.
- Hahn, J., Kolb, H.J., Schumm, M., Beisser, K., Ellwart, J., Rieber, P., Maldacker, J., Schwella, N., Losslein, L.K., Holler, E., Willmanns, W., Thierfelder, S., 1991. Immunological characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Ann. Hematol.* 63, 223–226.
- Haverson, K., Bailey, M., Higgins, V.R., Bland, P.W., Stokes, C.R., 1994. Characterization of monoclonal antibodies specific for monocytes, macrophages and granulocytes from porcine peripheral blood and mucosal tissues. *J. Immunol. Meth.* 170, 233–245.
- Jones, M., Cordell, J.L., Beyers, A.D., Tse, A.G.D., Mason, D.Y., 1993. Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *J. Immunol.* 150, 5429–5435.
- Klein, A.K., Dyck, J.A., Stitzel, K.A., Shimizu, J., Fox, L.A., Taylor, N., 1983. Characterization of canine fetal lymphohematopoiesis: studies of CFU_{GM}, CFU_L, and CFU_J. *Exp. Hematol.* 11, 263–274.
- Ladiges, W.C., Storb, R., Thomas, E.D., 1990. Canine models of bone marrow transplantation. *Lab. Ann. Sci.* 40, 11–15.
- Lunn, D.P., Holmes, M.A., Antezak, D.F., Agerwal, N., Baker, J., Bendali-Ahcene, S., Blanchard-Channell, M., Byrne, K.M., Cannizzo, K., Davis, W., Hamilton, M.J., Hannant, D., Kondo, T., Kydd, J.H., Monier, M.C., Moore, P.F., O'Neil, T., Schram, B.R., Sheoran, A., Stott, J.L., Sugiura, T., Vagnoni, K.E., 1998. Report of the Second Equine Leucocyte Antigen Workshop. Squaw Valley, California, July 1995. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62, 101–143.
- Manz, R.A., Arce, S., Cassese, G., Hauser, A.E., Hiepe, F., Radbruch, A., 2002. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 517–521.
- McSweeney, P.A., Rouleau, K.A., Storb, R., Bolles, L., Wallace, P.M., Beauchamp, M., Krizanac-Bengez, L., Moore, P., Sale, G., Sandmaier, B., de Revel, T., Appelbaum, F.R., Nash, R.A., 1996. Canine CD34: cloning of the cDNA and evaluation of an antiserum to recombinant protein. *Blood* 88, 1992–2003.
- McSweeney, P.A., Rouleau, K.A., Wallace, P.M., Bruno, B., Andrews, R.G., Krizanac-Bengez, L., Sandmaier, B., Storb, R., Wayner, E., Nash, R.A., 1998. Characterization of monoclonal antibodies that recognize canine CD34. *Blood* 91, 1977–1986.
- Miller, B.A., Lipton, J.M., Linch, D.C., Burakoff, S.J., Nathan, D.G., 1985. Thy-1 is a differentiation antigen that characterizes immature murine erythroid and myeloid hematopoietic progenitors. *J. Cell. Physiol.* 123, 25–32.
- Moore, P.F., Rossito, P.V., Danilenko, D.M., Wielenga, J.J., Raff, R.F., Severns, E., 1992. Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils. *Tiss. Antigens* 40, 75–85.
- Nagi, A.M., Babiuk, L.A., 1989. Characterization of surface markers of bovine gut mucosal leukocytes using monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22, 1–14.

- Neuner, E., Schumm, M., Schneider, E.M., Guenther, W., Ellwart, J., Kremmer, E., Vogl, C., Buettner, M., Thierfelder, S., Kolb, H.J., 1997. Immune phenotype of canine hematopoietic progenitor cells. *Tiss. Antigens* 50, 466–474.
- Niemeyer, G.P., Hudson, J., Bridgman, R., Spano, J., Nash, R.A., Lonthrop, C.D., 2001. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 29, 686–693.
- Prendergast, M.M., Bradstock, K.F., Broomhead, A.F., Hughes, W.G., Karbal, A., Berndt, M.C., Tiver, K., 1986. Monoclonal antibody analysis of canine hemopoietic cells. Role of Ia-like and Thy-1 antigens in bone marrow engraftment. *Transplantation* 41, 565–571.
- Price, P.W., Cerny, J., 1999. Characterization of CD4⁺ T cells in mouse bone marrow. I. Increased activated/memory phenotype and altered TCR Vbeta repertoire. *Eur. J. Immunol.* 29, 1051–1056.
- Schuening, F., Storb, R., Goehle, S., Meyer, J., Graham, T., Deeg, H.J., Pesando, J., 1987. Canine pluripotent hematopoietic stem cells and CFU-GM express Ia-like antigens as recognized by two different class II-specific monoclonal antibodies. *Blood* 69, 165–172.
- Seiffert, M., Cant, C., Chen, Z., Rappold, I., Brugger, W., Kanz, L., Brown, E.J., Ullrich, A., Bühring, H.J., 1999. Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counter-receptor CD47. *Blood* 94, 3633–3643.
- Sinkora, J., Řeháková, Z., Šinkora, M., Čukrowská, B., Tlaskalová-Hogenová, H., Bianchi, A.T.J., De Geus, B., 1998. Expression of CD2 on porcine B lymphocytes. *Immunology* 95, 443–449.
- Smith, S., Morris, J.E., Hoff, C., Davis, W.C., Weller, R.E., 1992. Immunophenotypic characterization of owl monkey peripheral blood mononuclear cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 653, 146–153.
- Spangrude, G.J., 1989. Enrichment of murine hematopoietic stem cells: diverging roads. *Immunol. Today* 10, 344–350.
- Tumas, D.B., Brasfield, A.L., Travenor, A.S., Hines, M.T., Davis, W.C., McGuire, T.C., 1994. Monoclonal antibodies to the equine CD2 T lymphocyte marker, to a pan-granulocyte/monocyte marker and to a unique pan-B lymphocyte marker. *Immunobiology* 192, 48–64.
- Wagner, J.L., Storb, R., 1996. Preclinical large animal models for hematopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* 3, 410–415.
- Yamaguchi, M., McSweeney, P.A., Kimball, L., Gersuk, G., Hong, D.S., Kwok, W., Storb, R., Beckham, C., Deeg, H.J., 1999. Recognition of major histocompatibility complex class II antigens by two anti-HLA-DR monoclonal antibodies on canine marrow cells correlates with effects on in vitro and in vivo hematopoiesis. *Transplantation* 68, 1161–1171.

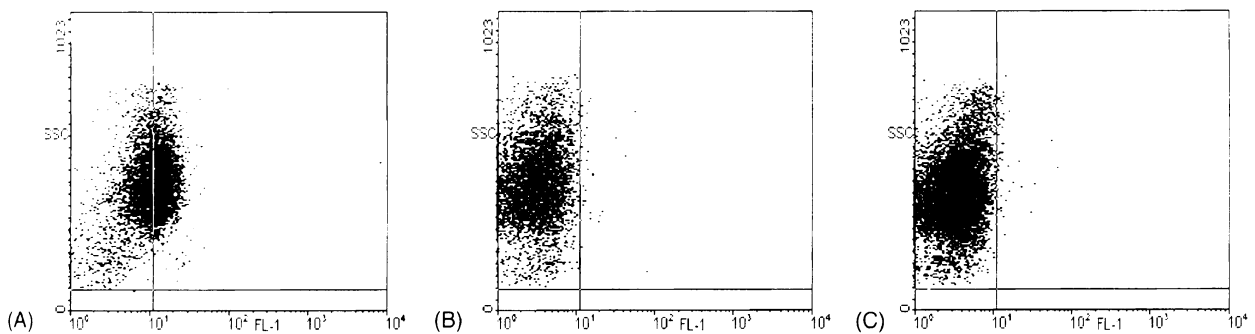


Fig. 3. Binding of mouse monoclonal antibodies of the IgG2a subclass to dog bone marrow granulocytes (A). Preincubation of cells with canine serum (B) resulted in the staining profile that was identical to that in unstained cells (C).

large mononuclears were observed. Interestingly, the small-to-large mononuclear ratio was independent of age. Essentially all HS-RC were CD45-positive with different levels of surface density (not shown).

Similar to other species, BM granulocytes were stained relatively bright with the anti-SWC3 mAb (not shown). In addition to heterogeneous CD4 expression in the granulocyte population, which has been previously demonstrated to be typical for dogs, our staining protocol has revealed the majority granulocytes to be CD8⁺ as well as TCR $\gamma\delta$ ⁺ (Fig. 3A). This was, however, unlikely as CD8 is restricted to T and NK lymphoid subsets in all species studied so far. Moreover, TCR $\gamma\delta$ expression cannot occur in cells without TCR gene rearrangement. As mAb used for TCR $\gamma\delta$ and CD8 staining are murine IgG2a, we have tested a hypothesis that something other than antigen-specific interaction is responsible for our unexpected observation. Indeed surface staining could be completely and partially blocked by preincubation of bone marrow cells with h.i. dog (Fig. 3B) and mouse serum, respectively. Similar results were obtained with 10 irrelevant murine anti-swine mAb of the IgG2a subclass (not shown). Interestingly, phylogenetically distant sera (goat, sheep, cow, pig) did not block non-specific binding of murine IgG2a mAb. A similar phenomenon has not been observed with murine mAb of other subclasses tested on dog HS-RC.

Staining with mAb recognizing surface markers on mature lymphoid subsets (CD3, CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$) has revealed the scarcity of mature lymphoid cells in neonatal BM. Essentially no CD3⁺ lymphocytes were present in neonatal bone marrow. In contrast, relatively large numbers of mature lymphoid cells were

found in adult BM HS-RC preparations (Table 2). This could not be due to peripheral blood contamination as relative proportions of individual lymphoid subsets differed significantly in peripheral blood and BM preparations (Table 2). The comparison of HS-RC isolated from dogs in the early postnatal period has indicated that the colonization of BM with mature lymphocytes begins between the second and fourth week of life (data for 4-week-old pups are also included in Table 2). Interestingly enough, the difference between the CD3⁺ cells and the sum of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes indicates that the majority of T cells were double negative (CD4⁻ CD8⁻).

3.2. Quantification and surface phenotype of CD34⁺ cells in neonatal dog bone marrow

When compared to a small group of three adult dogs with typically low relative numbers (<2%) of CD34⁺ in HS-RC isolated from BM, higher number of early

Table 2
Relative proportions of lymphocyte subsets in the small lymphocyte region of hypotonic shock-resistant cells from the bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) (comparison between bone marrow and peripheral blood in adult dogs)

Marker	Adult (<i>n</i> = 3)		4-Week-old pups (<i>n</i> = 4), BM
	BM	PB	
CD3	67.2 ± 3.6	80.2 ± 7.6	17.5 ± 11.9
CD4	21.8 ± 2.8	44.8 ± 6.7	1.5 ± 0.9
CD8	29.3 ± 4.9	22.6 ± 3.9	3.3 ± 1.8
$\gamma\delta$ -TCR	4.9 ± 2.9	2.4 ± 1.9	0.5 ± 0.4

[†] *P* < 0.05.

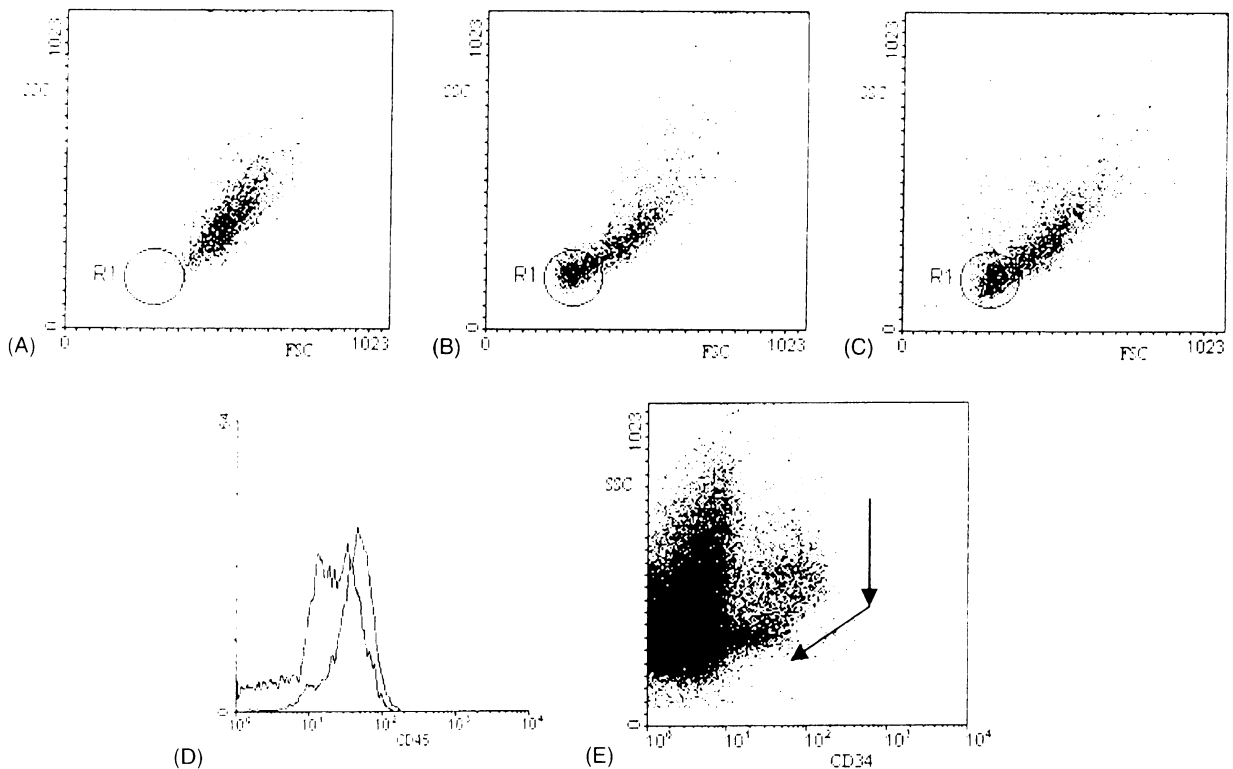


Fig. 4. Light scatter characteristics of CD34⁺ cells isolated from dog bone marrow by hypotonic shock (A) or ammonium chloride (B) treatment, and from an untreated specimen (C); gated for CD34⁺ events. Small mononuclear cells region is marked as R1. Expression of CD45 on hypotonic shock-resistant cells (gray) and cells isolated by ammonium chloride-mediated lysis (white) is shown in (D). Intensity of CD34 expression on untreated bone marrow cells is shown in (E). Arrows indicate the transition from the CD34⁺ to the CD34⁻ stage.

differentiation stages of hematopoiesis were found in cell preparations from neonatal pups and 3–9% of cells have been proved to bear CD34 on the surface. In the FSC/SSC diagram (Fig. 4A), these events mapped to the region with high FSC and low SSC values, respectively. We have thus concluded that CD34⁺ HS-RC belonged to the population of large (FSC^{hi}) mononuclear (SSC^{lo}) BM cells. CD34⁺ expression on HS-RC have also been compared both to cells isolated by a commonly used technique based on ammonium chloride-mediated depletion of mature erythrocytes and untreated bone marrow cells. Interestingly, the comparison of FSC/SSC dot plot showing the light scatter characteristics of CD34⁺ cells in ammonium chloride-treated cells (Fig. 4B) and untreated cells (Fig. 4C) with HS-RC (Fig. 4A) has revealed that an additional population of small CD34⁺ cells is present in BM preparations when no hypotonic shock has been applied. Whereas hypotonic shock provided almost 100% of CD45⁻ cells, the lysis with ammonium

chloride-based solutions resulted in cell suspensions containing significant numbers of CD45-negative cells and numerous CD45⁺ elements, most of them belonging to the erythroid lineage of hematopoiesis, were present in non-lysed BM cell preparations (Fig. 4D). Small CD34⁺ cells stained medium-to-dim with the anti-CD34 mAb and the transition from the CD34^{lo} to the CD34⁻ negative stage could be judged from the CD34 expression profile in the small mononuclear compartment in both ammonium chloride-treated (not shown) and untreated BM cells (Fig. 4E). Moreover, small CD34⁺ cells did not bind the anti-CD45 mAb, which further supported the hypothesis that these cells belonged to non-leukocyte lineages of hematopoiesis.

Canine CD34⁺ HS-RC were further characterized by simultaneous surface staining of cells with anti-CD34 and selected mAbs from the panel described in Table 1. CD34⁺ HS-RC in neonatal dog bone marrow were shown to be SWC3^{lo} (Fig. 5A) and to express

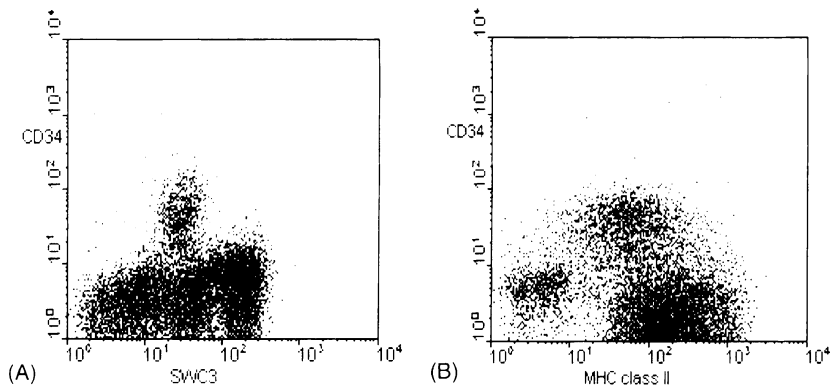


Fig. 5. Counterstaining of dog bone marrow hypotonic shock-resistant cells for CD34 and SWC3 (A) or MHC-class II (B); gated for mononuclear cells.

class II antigens at medium-to-high density (Fig. 5B). As expected, surface markers restricted to more differentiated lineages of hematopoiesis—CD3, CD4, CD8, CD21, TCR $\gamma\delta$, and IgM—were not present on dog CD34⁺ HS-RC (not shown). Importantly, small CD34⁺ cells in ammonium chloride-treated as well as untreated BM cells were both SWC3⁻ and class II-negative.

3.3. B cell precursors in the neonatal dog bone marrow

To visualize the B lineage of hematopoiesis in dog BM we have used the anti-CD79 α mAb HM57 with a broad interspecies cross-reactivity (Jones et al., 1993). After having proved that sIgM⁺ B cells are the only population in the dog peripheral blood that had reacted with HM57, we stained BM HS-RC with mAb from the panel in Table 1. The cells were then permeabilized and counterstained with R-PE-conjugated anti-CD79 α . For this kind of analysis, it is important to know that cell processing does not profoundly change FSC and SSC characteristics, and that mononuclear cells can be distinguished from granulocytes in the FSC/SSC dot plot. Fig. 6A documents that the IntrastainTM kit from DAKO fulfills this requirement and shows that granulocytes (R3) are distinguishable from both small (R1) and large (R2) mononuclear cells in dog BM cell preparations. The separate analysis of CD79 α expression on small and large BM mononuclear HS-RC has provided an unambiguous answer to the question what is the dominant population of neonatal BM mononuclear leukocytes.

In eight 1-day-old puppies from four litters analyzed, 80–85% of mononuclear HS-RC reacted with the HM57 mAb (Fig. 6B). CD21 expression was detected on the surface of a clearly distinguishable population (18–25%) of small CD79 α ⁺ cells (Fig. 6C), while only a few large mononuclear HS-RC reacted with anti-CD21 mAb (Fig. 6D). MHC class II antigens, on the other hand, were expressed almost ubiquitously on the surface of the CD79 α ⁺ population independent of the cell size (Fig. 6E and F). Interestingly, in the CD79 α ⁺ HS-RC population, MHC class II⁺ cells prevailed, too. The leukocyte common antigen CD45 was also present with variable density on all the HS-RC analyzed (Fig. 6G and H). Upregulation of both CD21 and CD45 on small CD79 α ⁺ HS-RC (Fig. 6E and G) was accompanied by a slight increase of the cell size as measured by the FSC value (not shown). The expression profile of the CD45RA isoform (Fig. 6I and J) strongly resembled that of the total surface CD45 (compare to Fig. 6G and H), namely in the CD79 α ⁺ compartment. Fig. 6K and L shows that all but a few CD79 α ⁺ mononuclear HS-RC are Thy-1⁺. By comparing Thy-1 and MHC class II expression on CD79 α ⁺ cells in Fig. 6E, F, K and L, it can be stated that class II⁺ Thy-1⁺ cells prevail in the minor CD79 α ⁺ mononuclear HS-RC population. Such a surface phenotype strongly suggests that these cells might be very early hematopoietic progenitors including only partially committed immediate progeny of HSC and very early stages of lymphopoiesis.

Last but not least, Fig. 6M and N contain a very important piece of information on early stages of B lymphogenesis in dogs. While small cells in the B



Characterization of porcine CD19 and anti-CD19 monoclonal antibodies

Jishan Sun^{a,*}, Jiri Sinkora^b, Nancy Wertz^a, Alena Moravkova^c, J.E. Butler^a

^a Department of Microbiology, The University of Iowa, Iowa City, IA 52242-1109, USA

^b DakoCytomation AG, Brno, Czech Republic

^c Institute of Animal Physiology and Genetics ASCR, Libechev, Czech Republic

Abstract

CD19 is an important pan B cell marker and co-stimulatory protein in humans and mice. Efforts to further characterize B cell ontogeny in swine have been hampered by the lack of monoclonal antibodies (mAb) to valuable surface markers like Vpre-B, CD19, CD34 and CD43. We report here on the complete nucleotide and deduced amino acid sequence of porcine CD19, the cross-reactivity of anti-human CD19 monoclonals and efforts to prepare anti-porcine CD19 mAb to bacterially-expressed products.

Porcine CD19 is highly homologous to those in the few other species studied, i.e. human, mouse and guinea pig, but only in certain domains. Among the 14 CD19 exons, homology approaches 90% to human CD19 in exons 6, 9, 11 and 12 and is ~80% with other species in this region. The highly homologous C-terminal cytoplasmic region contains nine tyrosines including the YEND/E motif that binds the SH2 domain of Fyn. Two different porcine CD19 isoforms that differ in their 3' UTRs were identified just as in human CD19. Thus, the signaling properties of CD19 may be similar to those in humans. On the other hand, only 60% sequence similarity was seen in exons 1–5 that encode the N-terminal extracellular region that is involved in ligand binding and is the target of CD19-specific mAb. This probably explains why only 1 of the 17 anti-human CD19 mAb tested recognized swine B cells. Furthermore, when the extracellular domains of CD19 were expressed in *E. coli*, mAbs to the bacterially-expressed product did not recognize CD19 on porcine B cells suggesting that carbohydrate-dependent conformation may determine antigenicity.

© 2004 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Swine; B cell; Sequence; Domains; Bacterial expression

1. Introduction

Leucocytes are derived from a common hematopoietic stem cell under rigid control by specific cytokines and the adhesion and co-stimulatory molecules associated with the stromal cell microenvironment (Kurosaki, 2002; Reya and Grosschedl, 1998). B, T and NK cells are derived from a common lymphoid progenitor that arises from a common hematopoietic stem cell. B cells arising from this progenitor can be recognized at various stages of development by their expression of certain CD markers (Benschop and Cambier, 1999). BCR expression only identifies certain developmental stages in the B cell lineage while other CD markers are present on B cells at all stages of development making them useful pan-specific markers. One such pan B cell marker is CD19, which is present on B cell lineages in mice and humans from the pro-B cell stage until plasma cell differentiation. CD19 is a co-receptor involved in B cell signaling, and

therefore also plays a critical role in B cell activation, differentiation and survival. Studies reveal that the CD19 complex, consisting of CD19, CD21, CD81 and Leu13, regulates B cell responses through the B cell receptor (Tedder et al., 1994; Hujimoto et al., 1998) and couple innate and adaptive immunity (Fearon and Carroll, 2000). Blocking with anti-CD19 antibody causes inhibition of the up-regulation of mitogen stimulation of B cells as evidenced by lower calcium influx (Pezzutto et al., 1987). CD19 deficient mice lack B-1 cells and their B-2 cell response to T-dependent antigens is reduced (Engle et al., 1995; Rickett et al., 1995). Signaling through the pre-BCR is impaired in CD19 deficient mice suggesting that it acts during the pro-B/pre-B transition (Otero and Rickert, 2003). Although the level of serum IgA remains unchanged in CD19^{-/-} mice, these mice exhibit poor responsiveness to oral immunization (Gårdby and Lycke, 2000).

Since B cell development and differentiation is characterized by CD marker profiles, monoclonal antibodies (mAb) to CD markers have been used to separate populations of B cells at different stages of development. By

* Corresponding author. Present address: Department of Microbiology and Immunology, Wake Forest University, Wake Forest, NC 27109, USA.

choosing combinations of antibodies against these markers, researchers can recover B cells at various developmental stages for more detailed studies (Bertrand III et al., 1997; Kehrl et al., 1994). Swine have proven to be especially useful immunological models because their epitheliochorial placentation prevents transfer of maternal immunoglobulins and antigen to the fetus and because of the precocial nature of their offspring (Butler et al., 1986; Rothkotter et al., 2003). The former allows immunooontogeny in individual piglets (because of size) to be studied during fetal life without concern that events are maternally or environmentally regulated. The latter means that newborn piglets can be reared in germ-free isolators (Miniatis and Jol, 1978) or in SPF autosows (Leece, 1969). It is now important to extend the technology used in mice to developmental studies of swine since several intriguing features of B cell lymphogenesis and differentiation in this economically and medically important species differs from that in mice. First, swine have a relatively simple immunoglobulin heavy chain variable gene locus, in which all V_H genes belong to one V_H gene family so that repertoire diversity of the heavy chain is mainly generated by junctional diversity in CDR3 not by combinatorial diversity as in humans and rodents (Sun et al., 1994; Butler et al., 2000). Light chain combinatorial diversity is also restricted since >90% of V_K genes belong to the IGKV2 family (Butler et al., unpublished) and expressed V_L genes belong to only four families and use primarily one J_L in a tandem J_L - C_L duplicon (Butler et al., unpublished data). Second, B cells developing in yolk sac and fetal liver have nearly 100% of their VDJ rearrangements in-frame as opposed to those developing later in bone marrow (Butler et al., 2000; Sinkora et al., 2003). Finally, non-selected pro-B cells are common in fetal thymus and most B cells in this organ have surprisingly switched to IgA, IgG and IgE (Butler et al., 2001; McAleer et al., unpublished). In an attempt to correct the deficiency in mAb to swine B cell markers, we have cloned and expressed porcine Vpre-B, CD19, CD34, and

CD43. In this report, we present the complete sequence of swine CD19 cDNA, the specificity of 17 anti-human CD19 mAb for porcine B cells and four raised against the extracellular domains of porcine CD19 expressed in bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Cloning strategy

Spleen, thymus and mesenteric lymph nodes were collected from a 110-day fetal pig and an adult pig. The collected cells were dissolved in Tri Reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH) and total RNA prepared as previously described (Butler et al., 2001; Sun et al., 1994). First-strand cDNA was synthesized using either random hexamers to amplify the middle and 5' end of the cDNA, or an oligo dT primer to recover of the 3' end of the sequence.

Middle region sequences was obtained by normal RT-PCR using degenerate primers derived from sequences of the homologous regions of CD19 in other species. 5'- and 3'-RACE were performed using GeneRacer (Invitrogen, Carlsbad, CA) and one-step PCR kits (Qiagen, Hilden Germany), respectively. Gene-specific primers and general primers which bind the linker and the poly(A) tail of mRNA were used for 5'- and 3'-RACE, respectively. All primers used in this study were purchased from Integrated DNA Technologies Inc. (Coralville, IA) and their sequences are listed in Fig. 1. Because the specificity of these degenerate primers was unknown, we applied a touch-down PCR protocol for RT-PCR. Briefly the denaturing and extension steps were set constantly at 94 °C for 30 s and at 72 °C for 40 s, respectively. The initial annealing temperature was 59 °C and after four cycles, we progressively decreased the temperature by increments of 3 °C. The amplification was terminated when the annealing temperature reached 38 °C. The PCR conditions for one-step PCR and GeneRacer PCR

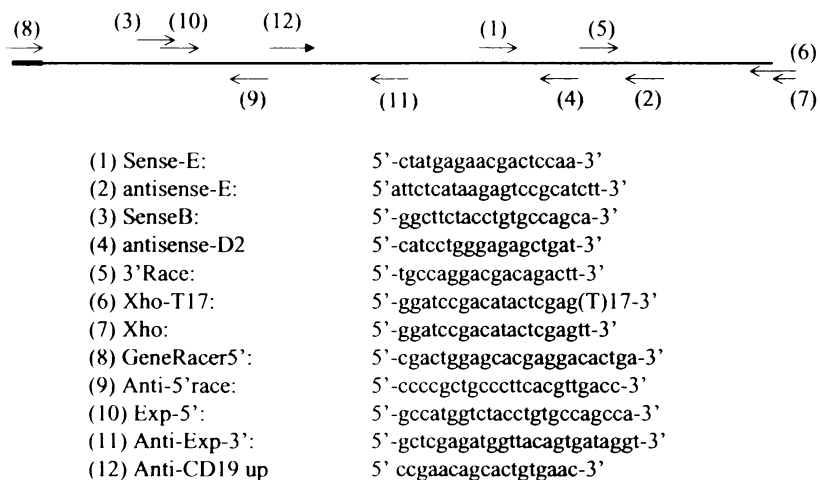


Fig. 1. Strategy for cloning of porcine CD19 and primers used. *Top*: Schematic showing the annealing sites for the various sense and antisense primers used for cloning. *Bottom*: Sequence of the primers used. The numbers correspond to those in the top schematic and are cited in the text.

followed the manufactures' instructions. PCR products from RT-PCR and one-step PCR were directly ligated into *EcoRV* digested pBlueScript (pPBS; Strategene, Calsbad, CA) whereas the PCR products recovered with GeneRacer were incorporated into the pCR4 Topo vector using Topo cloning technology.

Expression of CD19 by porcine T and B cells. The L23 B cell line (Bonefant et al., 2002) was grown in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum to a concentration of 10^6 ml^{-1} . Total RNA was prepared from the pelleted cells and placed in Trizoli as previously described (Butler et al., 2001).

Porcine CD4(+) and CD8(+) T cells were recovered from PBMC by positive selection on MACs microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) using anti-CD3 in the first round. The CD3-enriched population was then sorted by FCM using mAb specific for CD4 (74-12-4) and CD8 (PT36B IgG1). All mAb were from VMRD (Pullman, WA). FCM was done using fluorochrome-labeled second anti-mouse reagents on a EPIC ALTRA HPS sorter (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

First-strand cDNA was prepared from all cell preparations using random hexamers as previously described (Butler et al., 2001) after treatment of RNA for 15 min at room temperature with DNase I (Sigma, St. Louis, MO). A 281 bp segment of CD19 was amplified using antisense primer 11 (Fig. 1) and an upstream primer of the following sequence: 5'-ccgacagcactgtgaac-3'. PCR products along with size marker polynucleotides were separated on 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide (see Fig. 3A). Genomic DNA was prepared from adult mesenteric lymph node.

2.2. Bacterial expression

Tagged primers (exp-5/antiexp-3) were used to amplify an extracellular domain of porcine CD19 for bacterial expression. The PCR product was blunt-end ligated into *EcoRV* digested pBlueScript vector and used to transform DH5 α competent cells. The plasmid was purified and the desired insert was excised using *XhoI* and *NcoI*. The fragment was then re-ligated into a *XhoI* and *NcoI* digested expression vector (pET 26b; Novagen, Madison, WI). The construct was confirmed by sequencing and the plasmid was then used to transform the bacterial expression host, BL21(DE3). These cells were cultured in LB/ampicillin (50 $\mu\text{g/ml}$) at 37 °C until the density of the cell suspension reached an OD_{600nm} of 0.5. The bacterial culture was removed from the shaker and IPTG was added to the media at final concentration of 1 mM. The culture was allowed to incubate for an additional 4 h before harvesting. We also noted that the bacterially-expressed CD34 protein was located in inclusion bodies. Thus, most of the bacterial proteins were removed by centrifugation leaving the CD19 protein in the pellet. The pellet was washed three times with 20 mM Tris-HCl (pH8.0) and then dissolved in

8 M urea. Proteins dissolved in urea were loaded onto a 1 ml nickel chelater column (Pierce, Rockford, IL) that was pre-equilibrated with 8 M urea. The column was washed stepwise using 5 ml of MCAC buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 8 M urea) containing 40 and 100 mM imidazole, respectively. The bound, His-tagged protein was eluted with MCAC buffer containing 500 mM imidazole. To remove urea and imidazole, the effluent was dialyzed stepwise against 4, 2, 1 and 0.5 M urea in 20 mM Tris-HCl and then 20 mM Tris-HCl without urea. The purity of the bacterial-expressed protein was examined by SDS-PAGE and the quantity recovered determined using the Lowry method.

2.3. Sequence analysis

All cDNAs cloned into pBS or pCR4 Topo were sequenced using the T3 primer and the four-color automated Applied Biosystems capillary sequencer (Foster City, CA). Sequences were compared to those for other species in GenBank using the GCG program (Madison, WI). The amino acid sequence of cloned fragments and the exons they represent was deduced using the program described further. The homology of the porcine CD19 sequence to that of human CD19 was determined using programs in the GCG. Specifically, complete sequence comparisons and those of exons 1–4 and 5–14 among GenBank sequences for human, mouse and guinea pig CD19, were made using MACAW. The various Ig homology subtype domains were analyzed using the SMART program available on-line.

2.4. Preparation of monoclonal antibodies

The general procedure follows that of Galfre and Milstein (1981). Specifically, BALB/c mice were injected i.p. with 100 μg of bacterially-expressed CD19 together with 0.5 μg of CpG oligodeoxynucleotide 1826 (Hybridon, Milford, MA). Mice were boosted after 4 weeks with the same amount of immunogen and blood was collected from the retroorbital sinus 3–4 days later. All specificity testing was done using Western blotting to assure that only mouse antibodies to the correct bacterially-expressed CD19 protein were measured since it migrated to a defined position after electrophoresis. Briefly, the CD19 fragment purified on the nickel column was separated by SDS-PAGE and the separated proteins transferred nylon and only nylon fragments containing the transferred CD19 protein of interest, processed for conventional Western blotting (see further) in individual microtiter wells. Mice with positive responses to the CD19 product were again boosted to cause blastogenesis of responding cells. Four days later their spleens were harvested, hybridoma prepared and their specificity determined by the Western blotting procedure described earlier. Selected clones were then grown out, their supernatants harvested and concentrated using a device from Vivascience (Sortorius, Surrey, UK). Concentrated supernatants were

then evaluated by flow cytometry and by Western blotting on membrane extracts of a CD19(+) B cell line, i.e. L23.

2.5. Flow cytometric studies (FCM)

Hybridoma supernatants prepared as described earlier and anti-human CD19 reagents graciously provided by Dr. Tom Tedder (Duke University, Durham, NC) or purchased commercially were tested by FCM using an indirect staining method (Sinkora et al., 2003). Briefly, after red cell removal with the EasyLyse lysing solution (DakoCytomation AG, Denmark), adult pig peripheral blood leukocytes were incubated with prediluted mAb for 30 min, washed in the washing and staining buffer (WSB; PBS supplemented with 0.1% sodium azide and 0.2% gelatin from cold water fish skin; Sigma) and stained with RPE-conjugated F(ab')₂ fragments of goat anti-mouse Ig antiserum (DakoCytomation AG) diluted in WSB. After an additional washing step, 10,000 lymphocytes in each sample were analyzed on a four-color FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, La Jolla, CA). Results were recorded as negative, weak or positive based on the proportion of positive events (Table 2). In both weakly and strongly positive samples, the cells were further washed twice in WSB containing 10% mouse serum to block free binding sites in surface-bound secondary antisera. Cells were then counterstained with APC-conjugated HM-57 mAb to CD79 α which is broadly cross-reactive with B cells from many species including swine (Jones et al., 1993). Counterstaining was performed using the intrastain fixing and permeabilizing solution (DakoCytomation AG) according to the manufacturer's instructions. Two-color immunofluorescence data were acquired on the FACSCalibur and analyzed using the PC-LYSYS software (Becton Dickinson).

2.6. Western blotting

Extracts from induced bacteria or from a CD19(+) B cell line (Bonefant et al., 2002) were separated by SDS-PAGE electrophoresis on 12% gels. Briefly, 6×10^5 L23 cells were boiled in SDS-PAGE sample buffer and the equivalent of 60,000 cells loaded per lane of the gel. The gels were electroblotted to Immobilon-P using 50 V for 2 h in a cold box maintained at 4°C. For testing the specificity of the various mAb raised to CD19 expressed in bacteria or prepared to human CD19, sections of the blot containing bacterial-expressed CD19 were removed from the membrane and transferred to wells of a 96-well microtiter plate. Segments were blocked with 5% skim milk in 0.05% Tween 20 and PBS, incubated with mouse sera or hybridoma supernatants for 60 min at room temperature and then with a rabbit anti-mouse HRP conjugate. The color reaction was developed using bis-diaminobenzidine.

In subsequent studies, mAb determined to be specific for bacterial-expressed CD19, were tested in Western blots using the same protocol except that bacterial extracts and the membrane extracts of a porcine B cell line L23 were also

tested. As a positive control, the L23 extract was also tested using a polyclonal rabbit antibody to porcine IgG that primarily detects the porcine γ -chain.

3. Results

3.1. Complete sequence of porcine CD19

The strategy of PCR cloning is depicted schematically in Fig. 1. Primers used are designated by numbers in the description that follows. Five pairs of degenerate primers were designed based on to the sequences of CD19 from other species. One of these (sense-E (1)/antisense-E (2)) produced a fragment of pig CD19 that was confirmed by sequencing. We then designed antisense-D2 (4) and a 3'-RACE primer (5). The sense-B (3)/antisense-D2 (4), 3'-RACE (5) and Xho-T17/Xho (6, 7) were used to extend the sequence up- and downstream, respectively. We recovered the remaining 5' portion of the sequence by using 5'-RACE and GeneRacer5' (8)/anti-5'-RACE primers (9).

Fig. 2 shows the nucleic acid and deduced amino acid sequences of porcine CD19. For ease of comparison, we aligned the human sequences with those of swine. The amino acid numbering system starts from the first amino acid (glutamic acid) of the mature protein and the amino acids of the leader peptide are given negative numbers. Like human CD19, the extracellular portion of swine CD19 contains two typical immunoglobulin superfamily domains (Williams and Barclay, 1988), formed by disulfide bonds between C₂₂ and C₈₈, and C₁₉₁ and C₂₅₇, respectively. There are four potential glycosylation sites in the extracellular portion of the protein. Although porcine CD19 has the same potential glycosylation sites, the locations differ from those of human CD19. Four subtypes of Ig domains are recognized; Ig, IgC1, IgG2 and IgV. Using SMART (www.smart.embl-heidelberg.de) the Ig superfamily domains we recognized in porcine CD19 belong to the Ig subtype.

3.2. Species homology

The degree of homology among swine CD19 and that of other species for which sequences are available, is shown in Table 1. Comparisons were made among the entire sequences, the extracellular domains (exons 1-4) and the

Table 1
Comparisons of deduced protein sequences for CD19 among species^a

	Full protein	Exons 1-4	Exons 5-14
Human	72.6	60.3	84.8
Mouse	68.1	59.9	76.6
Guinea pig ^b	70.3	50.3	81.8

^a Data presented as percent homology.

^b The sequence of guinea pig is truncated at 5' end and about 125 amino acids is missing. This may affect the accuracy of the comparisons in full protein and exons 1-4.

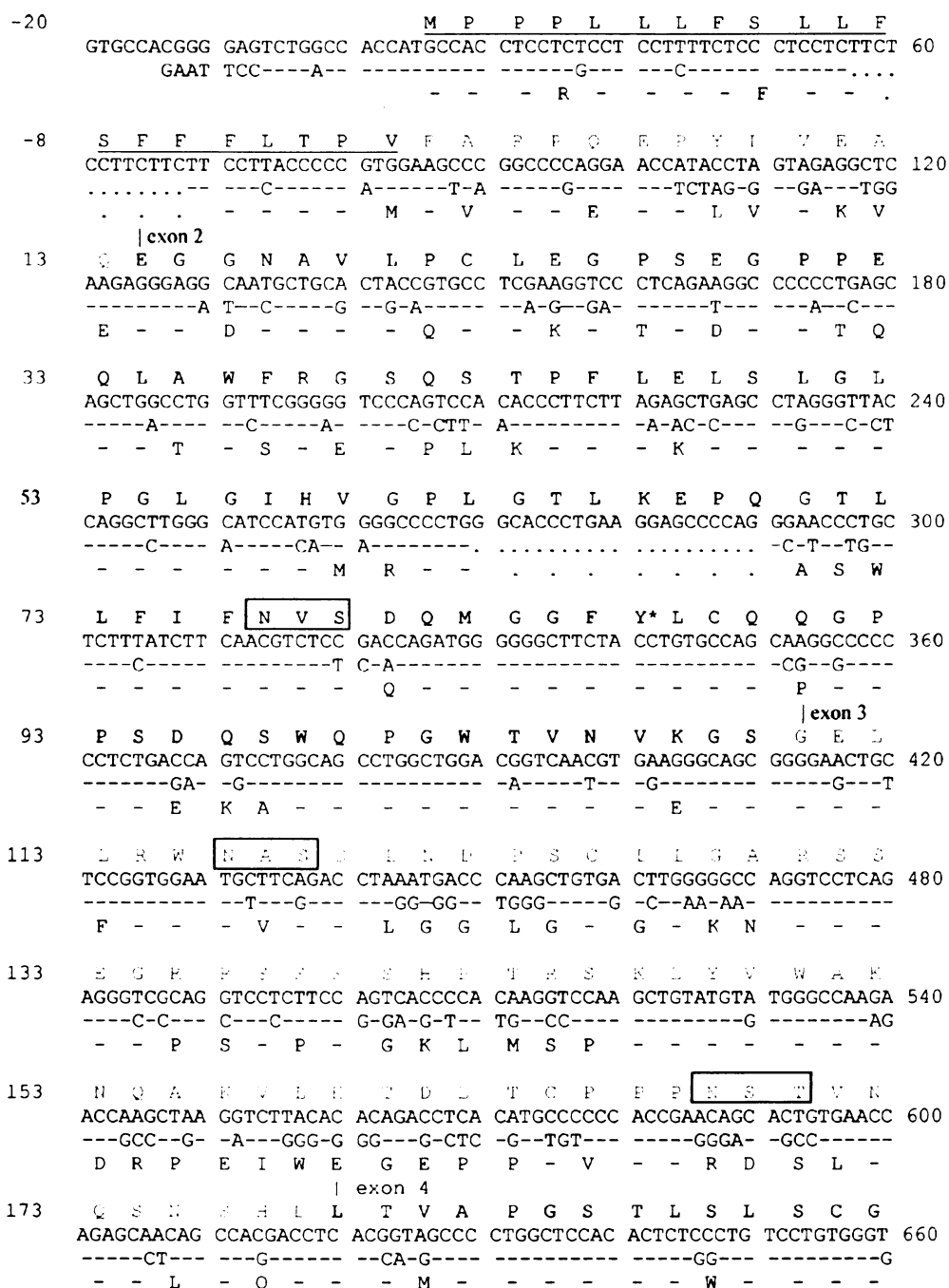


Fig. 2. The nucleotide and deduced amino acid sequence of porcine CD19. The sequence is aligned with that for human CD19. The deduced porcine amino acid sequence (top number in left margin) is shown above the nucleotide sequence while the human deduced amino acid sequence is shown below the human nucleotide sequence. Dashes indicate that the human nucleotide and amino acid is identical to that of the swine. The leader amino acid sequence is underlined and designated with negative numbers. The transmembrane segment is underlined. Potential glycosylation motifs are boxed. Boldface "Y" indicate potential sites for phosphorylation. The GenBank accession number is AF466765.

cytoplasmic domains (exons 5–14). Because the guinea pig sequence is 5' truncated, the homology values generated for the full sequence and the extracellular domains may not be accurate. Nevertheless, it is obvious that cytoplasmic domains show a much higher degree of species homology than the extracellular domains.

3.3. Alternative transcription and signaling motifs

Previous findings suggest that human CD19 is transcribed in two isoforms that differ at the 3' untranslated region. We found that the swine also occurs as two isoforms as determined by 3'-RACE PCR (Fig. 2). Like human, these

```

193  S S R A S L V R G P I S W I H V R P K K
    CGTCCCGTGC CTCACTGGTC AGAGGCCCCA TCTCCTGGAT CCACGTGCGT CCCAAGAAGC 720
    TAC---C--A ---TG--TC- --G-----C -----C ---T---AC -----GG--
    V P P D - V S - - - L - - T - - H - - G

213  H V K L L S L N L T E D A Q L R E M W V
    ATGTGAAATT GCTGAGCCTG AACOTGACGG AGGATGCCCA GCTCAGGGAG ATGTGGGTCA 780
    C-AA-TC--- -----A G-G---A-- -C---CG--C -GC---A--T -----A-
    P K S - - - - - K D - R P A - D - - -

233  M G S L R G K A V L L L P E A T A Q D A
    TGGGCAGCCT CAGGGGAAAG GCTGTTCTGT TGCTGCCCGA GGCCACAGCT CAAGATGCTG 840
    -----A-G-G----- --T-----CG -----C-----
    - . . . . . K T G - - - - R - - - -

253  D T Y H C N H G S V T T Q M R L K V T A
    ACACCTATCA CTGTAACCAT GGCAGCGTGA CCACCCAGAT GCGGCTGAAG GTCACTGCTC 900
    GA-AG---T- T---C---G- ----A-C--- ---TGTCAT- C-A---G--- A-----
    G K - Y - H R - N L - M S F H - E I - -
    | exon 5

273  R S T . . . . . T G R W Q V P V V T L
    GGTCACTA...TG GCATTGGCTG CTGGAGACTG GTGGCTGGCA AGTCCCTGTT GTGACTTTAG 960
    -C---CTA--- -C----- -AG----- -A- G---T-A-C- -----G-
    R P - L - - - - - R - - - - - K - S A - - -
    | exon 6

293  V Y L I F C L G S L V G F L H L E P A L
    TTTATCTGAT CTCTGCCTG GGTCCCTGG TGGGCTTCT TCATCTTCGA AGAGCCCTGA 1020
    C-----T-----T-----A-----A-----G
    A - - - - - C - - - - - I - - - - - Q - - -
    | exon 7

313  I L R R K R K R M T D P T R R F F F V T
    TCCTGAGGAG AAAAAGAAAG CGAATGACAG ATCCCACTAG AAGTTCTTC AAAGTGACGC 1080
    -----G-----T- -C-----C- G-A-----
    V - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

333  P P P E N G A C D D Y G N V L D L S T P
    CCCCTCCGGA AAATGGGGCC CAGAACCAGT ACGGGAACGT GCTCTCCCTC TCCACGCCCC 1140
    -T--C--A-G --GC--C-- -----G--T-- C---A---A
    - - - G S - P - - - - - - - - - P - -
    | exon 8

353  H D R . . . . . A A G L G A A V P S
    ACTCTGGCAC GGGACGCGCC CTGCGGTGGG CTGCAGGCCT GGGAGCCGCC GTGCCCTCCT 1200
    C---A---CT C----- -A---T----- -C----- ---G-G-A-T -CC--G--T-
    T - - L - - - Q - - - - - - - G T A - -

373  Y G N P R S D V Q E A R A A G S R S P P
    ACGGAAACCC GCGCAGCGAC GTCCAGGAGG CCAGAGCCGC GGGGTCCCGG AGCCCTCCAG 1260
    -T----- -A----- -----C-- ATG-----TT -----G--G-
    - - - S - - - - A D G - L - - - - -
    | exon 9

393  G T . . . . . A Y E E P D D E E G
    GAACCGGCC AGAAGAAGAG GAAGGGGAGG CCTACGAGGA GCCGGACAGT GAGGAAGGCT 1320
    --GTG----- -----G---T----- A--T----- -----G-A--
    - V - - - - - G - - - - - - - - - D
  
```

Fig. 2. (Continued).

isoforms may be the result of the differential use of poly(A) trapping sites. There are nine tyrosines in cytoplasmic domain of CD19. These potential sites for phosphorylation are conserved in sequences from all species. It has been shown that the tyrosine-containing motif, YEND/E, binds the SH2 domain of Fyn, a kinase belonging to the src kinase family (Chalupny et al., 1995). These SH2-binding motifs are also present in porcine CD19. Porcine tyrosine 416 corresponds to human T405 and porcine tyrosine 457 corresponds to

human T445. The conservation of these motifs suggests they are functionally important in all species.

3.4. Expression of porcine CD19 in bacteria and the specificity of mAb raised to the product

Since one goal of the current work was to prepare monoclonal antibodies against swine CD19, we cloned the partial sequence of the extracellular domains into the expression


```

| exon 10
413  R P F Y E D T S D D R P D L D S Q D G S
CCGAGTTCTA TGAGAACGAC TCCAACCTCG GCGGGGATCA GCTCTCCAG GATGGCAGCA 1380
-----T- -A-C- -----G
- - - - - Q - - - - -

433  N Y E N P E E G V L G P E D E D S F S N
ACTACGAAAA CCCTGAGGAG GGGTCTTGG GTCCTGAGGA TGAAGACTCC TTCTCCAACG 1440
G-----G-- -----T -A-CC-C-----
G - - - - D E P - - - - -
| exon 11 | exon 12
453  A E S Y E D F L E E L V Q I V A F T F D
CTGAGTCTTA TGAGAATGAG GATGAAGAGT TGGTCCAGCC GGTGCCAGG ACGACAGACT 1500
-----C-----C -AC-----C-----A-TG-----
- - - - - T - - - - - M -

473  F L S P H G S V W D P S R E A T S L S
TCCTGAGCCC CCATGGGTCA GTCTGGGACC CCAGCAGGGA GGCAACCTCC CTCGGGTCCC 1560
-----T-----C-----C-----A-----G-----
- - - - - A - - - - -

493  Q S Y E D M F P I L Y A A P Q L R S P R
AGTCTATGA AGATATGAGA CCCATCCTGT ATGCAGCCCC CCAGCTCCGC TCCTTTGAG 1620
-----G-----GGA-----A- -A- -G-
- - - - - G - - - - - H - I -

| exon 14
513  R D P L L L R E S D A D S Y E N M D N P
GCCAGCCTGG TCCAACCAC GAGGAAGATG CGGACTCTTA TGAGAATATG GATAATCCTG 1680
-----A-----T--T-----A-----C-----C-----
- - - - -

533  D G P E P A W G G G G H M G A W S T R ***-
ATGGGCCAGA ACCAGCATGG GGAGGAGGGG GCCACATGGG CGCCTGGAGC ACTAGGTGAT 1740
-----C-----G-----A-----C-----
- - - - - D - - - - - R - - T - -

GTATTCAGG TGAAGTCTG TCGATGGAAA CCACATGTCA AACCGGCCAA GTAACAAGTC 1800
TGAAAGTACA CAACGAGCAC TTCACAGAGC TGGAAGTGGA TCCAGAAATC TGGCTGCAGG 1860
TCTAGCCACT GTGCCTACCA CCTAATAAAC AGTCTAAGC TTCCAAAGCA TGAACACAGA 1920
CTTCAGAGCT AGAAGTCGCC GGGCCCTGAA ACCATCACTG TGTAGCAAGT GCCATCACAC 1980
CCAAATTCCT GTCTCAGGCA AAGGTGGGAT CGGTCACTCA TAGTCCTGGC ATCTCCTCCC 2040
TGTCTCTCCA GCGCCAGAGC TCTTCTGAAA CCTAGGACTG ACATCTAAAA CCCAGTCCCT 2100
CTCTGCCCC AGAAGTTTCG ATGCTCTCTG TAAGACTACC TAGACTTTTC AGCATCTACA 2160
TTTTTTTTTC TAGAATTCCT TTTCTTGATG CTCCTATTCT TTCTTCATAA TGTCCCGGGT 2220
TTGTCTTGA AAGTCTATTC TTTTTTTTAA ATCTCTGAAA CTTTATAGCT TACTTTAGCT 2280
GTATTAATGC TATTATGATA TGCCAGGCCA TTGCTTTAAT AAATTCTTTC CAAGTAATAA 2340
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

Fig. 2. (Continued).

vector, pET26b. This region starts at Y86 and ends at L210. The expressed protein was mainly recovered in inclusion bodies and was purified as described in Section 2. The molecular size of the bacterially-expressed protein was ca. 21 kDa which is consistent with the expected size of the fragment cloned into pET26b.

A total of 11 hybridoma were selected based on the ability of the secreted mAb to recognize the 21 kDa bacterial product in Western blots. Four of the highest producers, G1-1, G1-2, D5 and G4-1, were selected for more detailed study. Fig. 3A shows that the transcript for porcine CD19 is prominently expressed in the L23 B cell line but not in CD4(+)

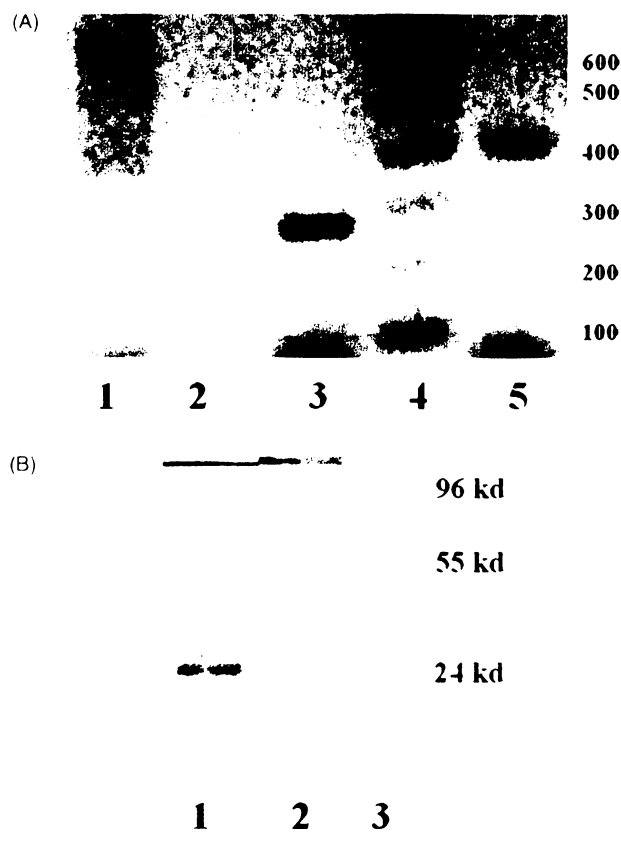


Fig. 3. Transcript expression of CD19 by a porcine B cell and specificity of mAbs to CD19 expressed by bacteria. (A) Expression of CD19 mRNA by a porcine B cell line and T cell subsets. cDNA prepared from L23 B cells and sorted CD4 and CD8 T cells and genomic DNA amplified with primers 11 and 12 indicated in Fig. 1. Lane 1: CD4 cells; lane 2: CD8 cells; lane 3: L23 cDNA; lane 4: 100bp polynucleotide ladder; lane 5: genomic DNA. (B) Specificity of mAb G1-1 for the 21 kDa fragment of bacterially-expressed CD19 (lane 1) and the membrane extracts of L23 B cells tested by Western blot (lane 2). The latter extract was also tested using a polyclonal antibody to porcine IgG (lane 3). Porcine CD19 and the IgG H chain in the membrane extract should be 95 and 55 kDa, respectively.

or CD8(+) T cells. Fig. 3B shows that mAb G1-1 raised to the extracellular domain of porcine CD19 readily recognizes the product expressed by bacteria but fails to recognize any protein extracted from the membrane of L23 cells and especially no protein of the expected 95 kDa. The same results were obtained with mAb G1-2, D5 and G4-1. As a control, we showed that the IgG heavy chain expressed on L23 cells was recognized by an anti-IgG polyclonal antibody (Fig. 3B). Results are summarized in Table 2.

3.5. Specificity by FCM

The four mAb described earlier were tested by FCM. All four anti-bacterial CD19 mAb gave only weak signals above background (Table 2). This finding was consistent with Western blot results (Fig. 3B). We also tested 17

Table 2
Flow cytometric analysis of anti-CD19 monoclonals

Clone	Reactivity on peripheral blood lymphocytes			Source
	Negative	Weak	Strong	
4G7	+			(Donor) Levy
B4	+			(Donor) Nadler
BU12	+			(Donor) Johnson
BU12		+		(Donor) Hardie
HD237	+			(Donor) Dorken/ Moldenhauer
H119a		+		(Donor) Chen
J4-166	+			(Donor) Pesando
J3-129		±		(Donor) Pesando
OKB19A (ED6)	+			(Donor) Rao
HB12a	+			(Donor) Tedder
HB12b		±		(Donor) Tedder
11G1		±		(Donor) van Lier
9D2	+			(Donor) Funderud
PDR134	+			(Donor) Pulford
HD37	+			DakoCytomation AG
J4-119	+			Immunotech
B-D3			+	Diaclone
G1-1		±		mAb to 21 kDa bacterial product
G1-2		±		mAb to 21 kDa bacterial product
G5		±		mAb to 21 kDa bacterial product
G4-1		±		mAb to 21 kDa bacterial product

anti-human CD19 mAb kindly provided by Dr. Tom Tedder or purchased from commercial sources. In the single-color staining experiment, all but one mAbs provided no or only a weak signal above the background level set using cells stained only with the RPE-conjugated secondary antiserum. The only exception—mAb B-D3 (Diaclone, Besançon, France)—stained expected numbers of lymphocytes in three different pigs at the staining level comparable to human samples. After single-color surface staining had been combined with intracellular detection of an intracellular epitope of CD79a, the B-lineage specificity of B-D3 was unambiguously confirmed while the other reagents proved B-lineage-negative (Fig. 4). Anti-CD79 α has been previously shown to be cross-reactive with various mammalian B cells. Anti-CD79 α was selected over anti-porcine Ig since anti-CD79 α uniformly detects B cells independent of their BCR expression which can be quite variable (Lalor et al., 1992).

4. Discussion

Our data confirm that swine also transcribes a gene for the pan B cell co-receptor CD19. The sequence data presented in this report indicate that while exons 5–14 are highly conserved among the few species that have so far

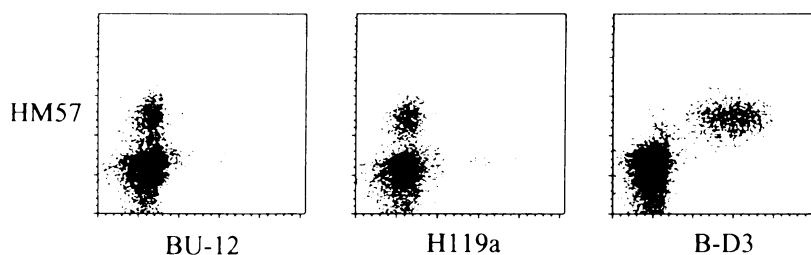


Fig. 4. Flow cytometric analysis of cross-reactive anti-human reagents. Data are provided for two weakly cross-reactive mAb (BU-12 and H119a) and the only anti-human CD19 mAb that is truly cross-reacting (B-D3). Porcine B cells are detected using anti-CD79 α (HM-57).

been studied (~80% homology; Table 1) those encoding the extracellular portion of CD19 are only 60% homologous. Since the CD19/CD21 complex is important to B cell regulation, these data predict that the signal transduction pathways may be similar in porcine and human B cells although the ligand for the extracellular domain may differ. The recovery of two alternative forms of CD19 differing in the 3' UTR, is consistent with data on human CD19. Whatever the role of these two forms in human B cells is likely to be the same in porcine B cells.

In our experience, it is unlikely that protein antigens sharing only 60% homology will be recognized by the same mAb. Data presented in Table 2 on the specificity of 17 anti-human CD19 mAb confirm this supposition. FCM and Western blotting also show that mAb raised against the extracellular portion of CD19 expressed in bacteria, recognize only the bacterial product but not CD19 on porcine B cells (Fig. 3B). This may not be surprising and is probably unrelated to the issue of species homology since this region of porcine CD19 is potentially heavily glycosylated and probably not properly folded as would be the case if expressed in eucaryotic cells capable of glycosylation. Regardless of this result, data presented in Table 2 suggest that the extracellular portion of porcine CD19 expressed epitopes that are distinct from the immunodominant epitopes on native human CD19 since only one of 17 recognized porcine B cells (Fig. 4). Since anti-CD79 α also detects B cells, one might conceive of its use to recover pan B cells in swine. The difficulty with this approach is that B cells must first be fixed and permeabilized since anti-CD79 α recognizes the conserved cytoplasmic portion of Ig α . Thus, B cells can be identified by this reagent but not recovered for functional studies.

The failure of most anti-human CD19 mAb to recognize the low homology extracellular domain of porcine CD19 might also suggest that the porcine ligand that binds the ligand-binding extracellular portion of porcine CD19 may have also diverged. Our identification of one useful anti-CD19 reagent should help characterize the several unique features of porcine B cell development and differentiation that have been described (Butler et al., 2000, 2001; Sinkora et al., 2003). The identification or preparation of additional mAb that can recognize certain Fc receptors, CD34, CD43 and Vpre-B can increase the definition of B cell subsets. While our ability to clone homologs of these

recognized B cell CD marker testifies to their existence it does not prove that their expression during B cell development in swine is the same as that in mice or humans and that commonly-recognized B cell CD markers in one species serve the same purpose in other species. Cloning molecular homologs and preparing CD-specific mAb that can be used to recover various B cell subsets and to block CD-ligand interactions, will allow the latter to be examined.

Acknowledgements

Research supported by NSF-MCB Grant 0077237 and NSF International Grant 99-04130 to J.E. Butler.

References

- Benschop, J.R., Cambier, J.C., 1999. B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 143–151.
- Bertrand III, F.E., Billips, L.G., Gartland, G.L., Kubagawa, H., Schroeder Jr, W., 1997. Ig DH gene segment transcription and rearrangement before surface expression of the pan-B-cell marker CD19 in normal human bone marrow. *Blood* 90, 736–744.
- Bonefiant, C., Vallee, I., Sun, J., Thibault, G., Guillaumin, J.M., Lebranchu, Y., Bardos, P., Butler, J.E., Watier, H., 2002. Analysis of the human CD4 T-lymphocyte proliferation induced by retrovirally-infected porcine lymphoblastoid B cell lines. *Zenotransplantation* 9, 1–13.
- Butler, J.E., Klobasa, F., Werhahn, E., Cambier, J.C., 1986. Swine as a model for the study of maternal-neonatal immunoregulation. In: Tumbleson, M.E. (Ed.), *The Swine in Biomedical Research*. Plenum Press, New York, pp. 1883–1899.
- Butler, J.E., Sun, J., Weber, P., Ford, S.P., Rehakova, Z., Sinkora, J., Lager, K., 2001. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. IV. Switch recombination, primarily in fetal thymus, occurs independent of environment antigen and is only weakly associated with repertoire diversification. *J. Immunol.* 167, 3239–3249.
- Butler, J.E., Weber, P., Sinkora, M., Sun, J., Ford, J., Christensen, R., 2000. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. II. Characterization of CDR3 diversity in the developing fetus. *J. Immunol.* 165, 6999–7011.
- Butler, J.E., Wertz, N., Wang, H., Sun, J., Wells, K. Antibody repertoire in fetal and neonatal pigs. VII. Characterization of the kappa light chain repertoire. *J. Immunol.*, unpublished.
- Chalupny, N.J., Aruffo, A., Chan, J.M., Bajorath, J., Blake, J., Ledbetter, L.K., Tepper, M.A., 1995. Specific binding of Fyn and phosphatidylinositol 3-kinase to the B cell surface glycoprotein CD19 through their Src homology 2 domains. *Eur. J. Immunol.* 25, 2978–2984.

- Engle, P., Zhao, L.-J., Ord, D.C., Sato, S., Koller, B., Tedder, T.F., 1995. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* 3, 39–50.
- Fearon, D.T., Carroll, M.C., 2000. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 393–422.
- Galfre, G., Milstein, C., 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 73. Academic Press, New York, pp. 3–46.
- Gårdby, E., Lycke, N.Y., 2000. CD19-deficient mice exhibit poor responsiveness to oral immunization despite total IgA level, germinal centers and IgA-isotype switching in Peyer's patches. *Eur. J. Immunol.* 7, 1861–1871.
- Hujimoto, M., Poe, J.C., Inaoki, M., Tedder, T.F., 1998. CD19 regulates B lymphocyte responses through transmembrane signals. *Semin. Immunol.* 10, 267–277.
- Jones, M., Cordell, J.L., Beyers, A.D., Tse, A.G., Mason, D.Y., 1993. Detection of T and B cells in many species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *J. Immunol.* 150, 5429–5435.
- Kehrl, J.H., Riva, A., Wilson, G.L., Thévenin, C., 1994. Molecular mechanism regulating CD19, CD20 and CD22 gene expression. *Immunol. Today* 15, 432–436.
- Kurosaki, T., 2002. Regulation of B cell fates by BCR signaling components. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 341–347.
- Lalor, P.A., Nossal, G.J., Sanderson, R.D., McHeyzer-Williams, M.G., 1992. Functional and molecular characterization of single (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl (NP) specific IgG1⁺ B cells from antibody-secreting and memory B cell pathways in C57BL/6 immune response to NP. *Eur. J. Immunol.* 22, 3001–3011.
- Leece, J.G., 1969. Rearing colostrum-free pigs in an automatic feeding device. *J. Anim. Sci.* 28, 27–33.
- McAleer, J., Weber, P., Sun, J., Butler, J.E. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. XI. The thymic B cell repertoire develops independently from that in blood and mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.*, unpublished.
- Miniatis, O.P., Jol, D., 1978. Gnotobiotic pig derivation and rearing. *Can. J. Comp. Med.* 42, 428.
- Otero, D.C., Rickert, R.C., 2003. CD19 function in early and late B cell development. II. CD19 facilitates the pro-B/pre-B transition. *J. Immunol.* 171, 5921–5930.
- Pezzutto, A., Dorken, B., Ribinovitch, P.S., Ledbeter, J.A., Moldenhauer, G., Clark, E.A., 1987. CD19 monoclonal antibody HD 37 inhibits anti immunoglobulin-induced B cell activation and proliferation. *J. Immunol.* 138, 2793–2799.
- Reya, T., Grosschedl, R., 1998. Transcriptional regulation of B-cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 158–165.
- Rickett, R.C., Rajewsky, K., Rose, J., 1995. Impairment of T cell-dependent B cell responses and B-1 cell development of CD19-deficient mice. *Nature* 376, 352–355.
- Rothkotter, H.J., Sowa, E., Pabst, R., 2003. The pig as a model of developmental immunology. *Hum. Exp. Toxicol.* 21, 533–536.
- Sinkora, M., Sun, J., Sinkorova, J., Christenson, R.K., Ford, S.P., Butler, J.E., 2003. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VI. B cell lymphogenesis occurs in multiple sites with differences in the frequency of in-frame rearrangements. *J. Immunol.* 170, 1781–1788.
- Sun, J., Kacskovics, I., Brown, W.R., Butler, J.E., 1994. Expressed swine VH genes belong to a small VH gene family homologous to human VHIII. *J. Immunol.* 153, 5618–5627.
- Tedder, T.F., Zhao, L.-J., Engel, P., 1994. The CD19/Cd21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol. Today* 15, 437–472.
- Williams, A.F., Barclay, A.N., 1988. The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 381–405.

Original Articles

Immune Characterization of the Lewis Rats Inoculated with K2 Sarcoma Cell Line and Newly Derived R5-28 Malignant Cells

(rat sarcoma / malignancy / myeloid cells / splenomegaly / natural killer cells / cytotoxic cells)

A. MORÁVKOVÁ¹, O. MÁLEK^{1,3}, E. POKORNÁ^{1,2}, J. STRNADEL^{1,3}, J. HRADECKÝ¹, V. HORÁK¹

¹Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Liběchov

²Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague

³Czech University of Agriculture, Prague

Abstract. Sarcoma is a relatively rare malignant disease with high mortality, bad prognosis and response to conventional therapy. Two possible models of this disease were tested: the K2 rat sarcoma cell line, which was described previously, and the new rat R5-28 cell line derived from a spontaneously growing rat neoplasm with sarcoma morphology. While all rats inoculated with K2 cells developed tumours at 22th–25th day after inoculation (D = 22–25), only 60%–75% of R5-28-inoculated rats were affected by tumours. The frequency and progress of the disease depended on the number of inoculated cells. No metastases were detected in both cases. All affected animals showed large splenomegaly. A possible response of some immune system components to tumours was tested. No tumour-infiltrating lymphocytes were revealed in the tumour tissue. Anti-tumour antibodies were not found in tumour-bearing animal sera. Appropriate changes in peripheral blood lymphocyte subsets were explored. While the relative numbers of both NK cells and Tc were impaired, no changes were noted in numbers of CD4+CD8- T helper cells. Leukocytosis with highly increased numbers of CD11b+ myeloid cells displaying variable expression of CD4 was detected in terminal stages of the disease.

Sarcomas are rare but aggressive tumours of mesenchymal origin. They consist of poorly differentiated or undifferentiated tumour cells. On that account sarco-

mas compose several heterogeneous histological groups with different clinical markers. Prognosis is usually bad and standard therapies remain limited.

Several animal models of sarcoma are known, one of them was described by Pokorna et al. (1994). K2, T15 and A8 Lewis rat sarcoma cell lines were established. Their shape, cytoskeletal structure and mobility were determined *in vitro*. Different metastatic potential was shown for the three sarcoma cell lines. Rats inoculated subcutaneously with K2 cells manifested pulmonary metastases only occasionally (low malignancy), T15 cells gave rise to metastases in 40% (intermediate malignancy) and A8 cells developed metastases in 80% of animals (high malignancy).

Contrary to other tumours such as melanoma or colon carcinoma, sarcomas are not very well defined from the immunological point of view, particularly due to the variety of differentiation stages of tumour cells and therefore wide spectra of expressed antigens. It was shown recently that more than 70% human sarcomas bear tumour testicular antigens NY-ESO-1 and SP110 (Ayyoub et al., 2004). Two possible routes of immune reaction against these antigens were described. Tumour-specific CD8⁺ T lymphocytes were found in human synovial sarcoma (Ayyoub et al., 2004). This observation accords well with the generally accepted theory that the main anti-tumour immune response is of Th1 (inflammatory) type, which involves mainly activation of cytotoxic immune cells. However, specific anti-tumour antibodies were found in sera of sarcoma patients recently (Segal et al., 2005).

To identify host-tumour interactions and immune system changes in this cancer disease we utilized the Lewis rat sarcoma model. We selected the low-malignant K2 cells to develop subcutaneous tumours in experimental animals. Tumour growth, metastatic potential and abundance of immune cells in peripheral blood were monitored. We also included in this study

Received October 6, 2005. Accepted October 17, 2005.

This work was supported by grants IAPG/05/16, GACR 524/04/0102 and by IRP IAPG No. AVOZ50450515.

Corresponding author: Alena Morávková, Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rumburská 89, 277 21 Liběchov. Tel.: (+420) 315 639 573; Fax: (+420) 315 639 510; e-mail: Moravkova.Alena@seznam.cz.

Abbreviations: D – day, DC – dendritic cells, iMC – immature myeloid cells, NK – natural killer, PCNA – proliferating cell nuclear antigen, Tc – cytotoxic T lymphocyte.

new R5-28 cells originating from a tumour with sarcoma histology (spontaneously growing in a female Lewis rat) that was isolated recently in our laboratory to characterize them *in vivo*.

Material and Methods

Animals

Rats of the Lewis strain used in this study were obtained from the Institute of Physiology in Prague (Academy of Sciences of the Czech Republic). Twenty-six male rats were used in total. Two groups of rats (18 animals) received R5-28 cells, four rats were inoculated with K2 cells, and four animals used as a negative control were injected with PBS. Peripheral blood was obtained from vena caudalis of each experimental and control animal twice a week starting from day (D) = 0 until the end of the study, D = 45, D = 35, or D = 70 (K2- inoculated, R5-28-inoculated group B, group A, and control rats, respectively).

Cells

The K2 cells (Pokorná et al., 2003) were cultivated *in vitro* using DMEM medium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich).

We isolated the R5-28 cells recently from a spontaneously growing Lewis rat tumour with sarcoma histology. These cells were expanded *in vitro* in DMEM medium with 10% FCS, frozen in aliquots and stored in liquid nitrogen for following experiments.

Both the K2 and R5-28 cells growing *in vitro* were washed with PBS, trypsinized and gently washed twice in PBS before injection. Cell suspensions were applied subcutaneously into two places on the back at a dose of 3×10^5 or 5×10^5 cells in 0.1 ml PBS for group A or group B, respectively. The control rats were injected with 0.1 ml PBS per place only.

Antibodies

Monoclonal mouse anti-rat FITC or RPE-conjugated primary CD3, CD4, CD8 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and CD11b (Serotec, Kidlington, UK) antibodies were used for FACS analyses.

For immunohistochemical staining, anti-vimentin (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), anti-cytokeratin 18 (Labsystems, Helsinki, Finland) and anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) antibodies were used.

Staining of blood cells and FACS analysis

For FACS analysis, we followed the staining protocol for Easy Lyse solution (Dako Cytomation) with minute modifications. Briefly, 50 μ l of whole heparinized blood were mixed with 1 μ l of each antibody per sample and incubated for 30 min at room temperature in the dark. Thereafter, 1 ml of Easy Lyse

working solution was added and incubated for 10 min. After incubation, samples were washed in PBS with 0.2% gelatin from cold water fish skin (Sigma) and 0.1% sodium azide, centrifuged (200 g, 5 min, 4°C) and immediately measured in the FACS Calibur (Becton Dickinson). Data from the cytometer were evaluated using Summit software (Dako Cytomation).

Blood smears were stained for microscopic analysis using standard May-Grünwald and Giemsa-Romanowski staining.

Immunocytochemical staining

Cells were grown *in vitro* on glass coverslips in DMEM medium with FCS until they almost reached confluence. Then, the medium was removed, cells were washed shortly in PBS and fixed with cold ethanol for 10 min. After washing in PBS with 0.2% bovine serum albumin (BSA) (3 times, 5 min each), unspecific staining was blocked with 10% goat serum and primary antibodies were applied overnight in 4°C. Thorough washing in PBS with 0.2% BSA followed and cells were incubated in the dark with appropriate Cy3-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. Cell nuclei were counterstained with DAPI. Finally, stained cells were embedded in Mowiol with propyl gallate and evaluated with a Provis AX70 fluorescent microscope (Olympus, Prague, Czech Republic).

Non-fixed cryosections of tumour tissue were used to determine the presence of anti-tumour antibodies (Alexander et al., 1996). Samples were blocked with 2% BSA in PBS and incubated 1 h at room temperature with plasma collected from experimental animals and diluted 1 : 100 in PBS. FITC-conjugated rabbit anti-rat Ig was used as secondary antibody. Cell nuclei were counterstained with DAPI.

Results

K2 sarcoma cells form highly progressive sarcoma tumours in the Lewis rat

Four Lewis male rats were inoculated with K2 cells as described above (day D = 0). No significant changes in the health status were seen in first two weeks after K2 cell application. The first macroscopic tumours were observed on D = 22–25 in all animals. Once the tumours appeared, extensive tumour growth and disease progression started. All animals became apathetic and cachectic with large (71 x 43 x 32 mm) tumour lesions within 3 weeks. Rats were sacrificed shortly before death due to tumour progression in advanced stage of the disease (D = 45). No spontaneous regression of sarcoma tumours was observed.

Subcutaneous tumours were freely movable and capsulated in connective tissue. Tumour vascularization was weak and mainly superficial. The central part of all tumours was necrotic, but no cysts, haemorrhagic areas or cavities filled with fluid were found there. In two

animals, initially subcutaneous tumours penetrated into abdominal and thoracic cavity, respectively.

Splenomegaly (51 x 15 mm vs. 34 x 9 mm in control rats) was found at autopsy in tumour-bearing animals. No other organs were pathologically changed and metastases of the sarcoma cells affected no inner organs.

R5-28 cells form tumours in 60% of inoculated Lewis rats

The cells named R5-28 were derived from a spontaneous neoplasm that developed in one Lewis rat kept in our laboratory. These cells were expanded *in vitro* and partially characterized. The cells have a spherical shape with short dendritic protuberances (Fig. 1). Immunocytochemical analysis showed that these cells are positive for vimentin and negative for cytokeratin 18. Staining performed for PCNA showed positivity in almost all cells. It corresponds well with good proliferation of R5-28 cells *in vitro*. Particular morphological and immunocytochemical characterization of the R5-28 cells is a matter of running experiments *in vitro*.

The malignancy and tumorigenicity of the R5-28 cells was determined in two groups of male Lewis rats inoculated subcutaneously with different quantities of R5-28 cells (day D = 0). To study the relation between the tumorigenic potential and quantity of inoculated R5-28 cells, we divided rats into two groups. Group A

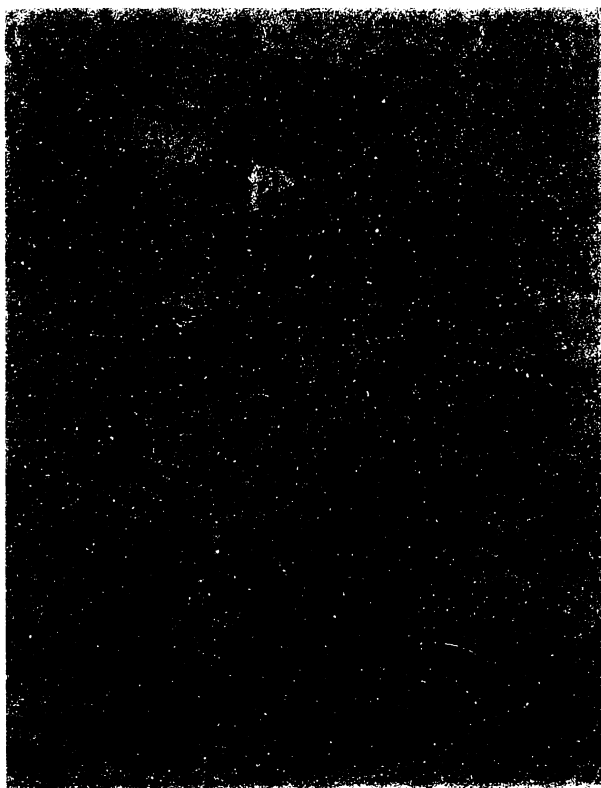


Fig. 1. R5-28 cells *in vitro*. Cells have spherical shape with dendritic protuberances and are easily maintained *in vitro*.

(10 animals) obtained the same dose as K2-inoculated rats (3×10^5 cells/ml). Group B (8 animals) was injected with a higher dose (5×10^5 cells/ml). No significant changes in the health status of animals were seen during two weeks after R5-28 cell administration.

Tumours in group A appeared subsequently in the 4th week after cell inoculation (3 animals on D = 25; 2 animals on D = 27; 1 animal on D = 31). The other four animals developed no tumour over the whole experiment (D = 70). Relatively slow, but constant tumour progression was obvious in all tumour-bearing animals without any signs of spontaneous regression. Their health status after five to six weeks (D = 36–45) was practically the same as in K2 sarcoma-bearing rats in terminal stage of the disease, including tumour size (74 x 52 x 36 mm) (Fig. 2). All tumour-bearing as well as non-affected and control (PBS injected) animals were sacrificed on D = 70.

The situation in group B was slightly different. The first tumours appeared already on D = 14 in 75% of rats (six animals). However, there was a significant variation among individuals. Whereas three rats quickly developed larger tumours (14 x 30 mm on average), another three animals bore only small tumours (10 x 12.5 mm on average) on D = 14. The two remaining animals never developed any visible tumours over the whole experiment. The next progression of tumours clearly depended on the state of the disease on D = 14. All severely affected rats showed rapid tumour growth with fast general pathogenetic changes and were sacrificed on D = 35 due to bad health condition. By contrast, rats that showed only small tumours in early stages of the disease stopped tumour growth on D = 18 and subsequently regressed spontaneously. Finally, no tumours were detected on D = 27 and all three animals were without any pathological findings until D = 50. We can therefore conclude that a high dose of R5-28 cells induced tumours in 75% of animals (vs. 60% in group A). On the other hand, no spontaneous tumour regression was detected in group A, while in group B 50% of mildly affected animals rejected tumours in a short time.



Fig. 2. Tumour-bearing rat 45 days after R5-28 cell application.

To determine the immunogenicity of R5-28 cells and to decide whether or not there is some immunologic memory, we re-injected three animals recovered by spontaneous regression with 5×10^5 R5-28 cells. No tumours were detected even on D = 80.

The histological features of growing R5-28 tumours were the same for both groups of tumour-bearing animals. All tumours were freely movable, capsulated in connective tissue, similarly to K2 tumours. The inner part of R5-28 tumours was heavily necrotic, with large haemorrhagic cysts filled by clear red fluid. Tissue samples taken from all tumours at autopsy showed sarcoma-like morphology on histologically stained sections. Similarly as in the K2 tumour-bearing rats, the spleens of R5-28 tumour-bearing rats were enlarged in size (49 x 13 mm), in contrast to non-affected rats (34.5 x 9 mm) and control animals (34 x 9 mm). No other organs were pathologically changed or affected by metastases.

Interaction of immune cells with tumours

Interactions of some components of the immune system with both K2 and R5-28 tumour cells were monitored. No leukocyte infiltration was observed either by histology or by flow cytometry (not shown) in samples taken from K2 and R5-28 subcutaneous tumours at autopsy. No anti-tumour antibodies were detected in the plasma of both K2- and R5-28- inoculated rats by immunohistochemical methods.

FACS analysis of peripheral blood showed that the relative number of NK cells and Tc slightly increased after inoculation with both K2 and R5-28 cells as compared to control animals, where no significant changes were noted. A decrease of relative NK and Tc cell numbers was observed after this elevation during following weeks. This decrease was noted in K2 tumour-bearing animals as well as in R5-28 inoculated (both tumour-bearing and non-affected) rats. However, these changes were not found in control animals. No significant changes occurred in CD4⁺CD8⁻ helper cells during the study in experimental and control animals.

As tumours progressed, myeloid cell populations strongly increased and nearly surpassed lymphocytes in terminal stages of the disease. All these cells showed CD11b on the cell surface. The majority of these cells fell into the FSC^{hi}SSC^{hi} cell compartment in FACS analysis. Besides that, a new population of FSC^{hi}SSC^{med} cells appeared in flow cytometry around D = 20, D = 30 or D = 14 for K2 tumour and group A or group B of R5-28 tumour-bearing rats, respectively. These cells were classified as CD45⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻CD11b⁺ (Fig. 3) and their number increased as the tumours progressed. It was in contrast to control animals, where most of SSC^{med}CD11b⁺ cells co-expressed CD4, so they could be classified as monocytes. In tumour-bearing animals of all groups, CD11b⁺CD4⁻ cells surpassed the CD11b⁺CD4⁺ population as the disease progressed. Histologically, a significantly

increased number of myeloid cells (20% in controls vs. 90% of myeloid cells in tumour-bearing rats) with highly segmented nuclei was confirmed in blood smears (Fig. 4). Moreover, myeloid cells in blood of control animals had 9.3 μm in diameter, whereas in tumour-bearing animals it was 10.5 μm . However, this difference was not statistically significant.

Discussion

Mouse and rat inbred strains with inoculated tumour cells are often used as animal models of various cancers. Interactions of tumour and immune cells, cytokine expression and effect of new therapeutic procedures or anti-tumour drugs can be easily monitored using such models. We utilized in our study Lewis rats with inoculated K2 and R5-28 rat tumorigenic cells to reveal a potential reaction of the immune system to growing subcutaneous tumours since application of the sarcoma cells to final stages of the cancer disease. All animals that obtained K2 sarcoma cells showed tumour growth, in agreement with our previous results (unpublished). Tumour progression was very rapid and animals were dying during 7 weeks after inoculation. Contrary to Veselý et al. (1987) we did not find lung metastases in tissue sections. However, Veselý and colleagues described only low metastatic potential of K2 cells. No more than one or two metastases per 10% of inoculated animals were found. This low metastatic potential is compatible with our previous observation. Although we used four animals in this experiment only, more than 10 other experiments with K2 cells were done before and approximately 10% of animals showed metastases generally.

The R5-28 cells were derived from a spontaneously growing rat neoplasm. These cells growing *in vitro* show mainly spherical shape with small dendritic-like protuberances. Pokorná et al. (2003) compared three rat sarcoma cell lines, and the R5-28 cells are similar in shape to K2 cells. This morphotype is characteristic for slow-moving cells with low malignancy, which R5-28 cells are. Immunocytochemical staining determined these cells as vimentin-positive and cytokeratin 18-negative. These findings correlate well with the observed sarcoma-like histology of subcutaneous R5-28 tumours and confirm the mesenchymal origin of these cells. Almost all R5-28 cells also show positivity for PCNA, which is involved in cell division. This suggests high proliferative capacity of R5-28 cells.

Two groups of Lewis rats were inoculated with R5-28 cells. Group A obtained 3×10^5 cells/ml, group B was inoculated with 5×10^6 cells/ml. In group A (N = 10) tumours developed in six animals after 25–31 days. The remaining four animals did not show any symptoms during all the experiment (70 days) and no pathological changes were observed in tissue sections. In group B (N = 8) tumours developed in 75% of animals

(N = 6). One half (N = 3) of affected rats showed larger tumours with rapid progression. However, the second half of affected rats (N = 3) developed only small tumours and these neoplasms were quickly rejected. The remaining two animals did not develop any tumour during the whole experiment (D = 70). The R5-28 cells were derived from a Lewis rat spontaneous neoplasm, so it was supposed to be synergic. Nevertheless, some genetic or expression pattern abnormalities may have occurred by neoplasm developing *in vivo*. Moreover, there could be some variability in genes participating in immunosurveillance among animals of the Lewis inbred line. R5-28 may thus not be absolutely synergic for all animals, and/or the immune system balance and

responsiveness among rats differs. In any case, rejection of the R5-28 tumour cells has to occur shortly after inoculation, because no tumours were observed in 40% of rats in group A. On the contrary, three animals of group B showed tumour rejection shortly after appearance. This surprising finding could be paradoxically explained by the lower dose of R5-28 cells in group A. A lower number of tumour cells may be rejected very rapidly after application, so that no macroscopic marks of tumour growth were observed. Contrary to that, a higher number of R5-28 cells can form small tumours that are subsequently destroyed by the immune system. The experiment with repeated administration of R5-28 cells into rats of group B that underwent spontaneous

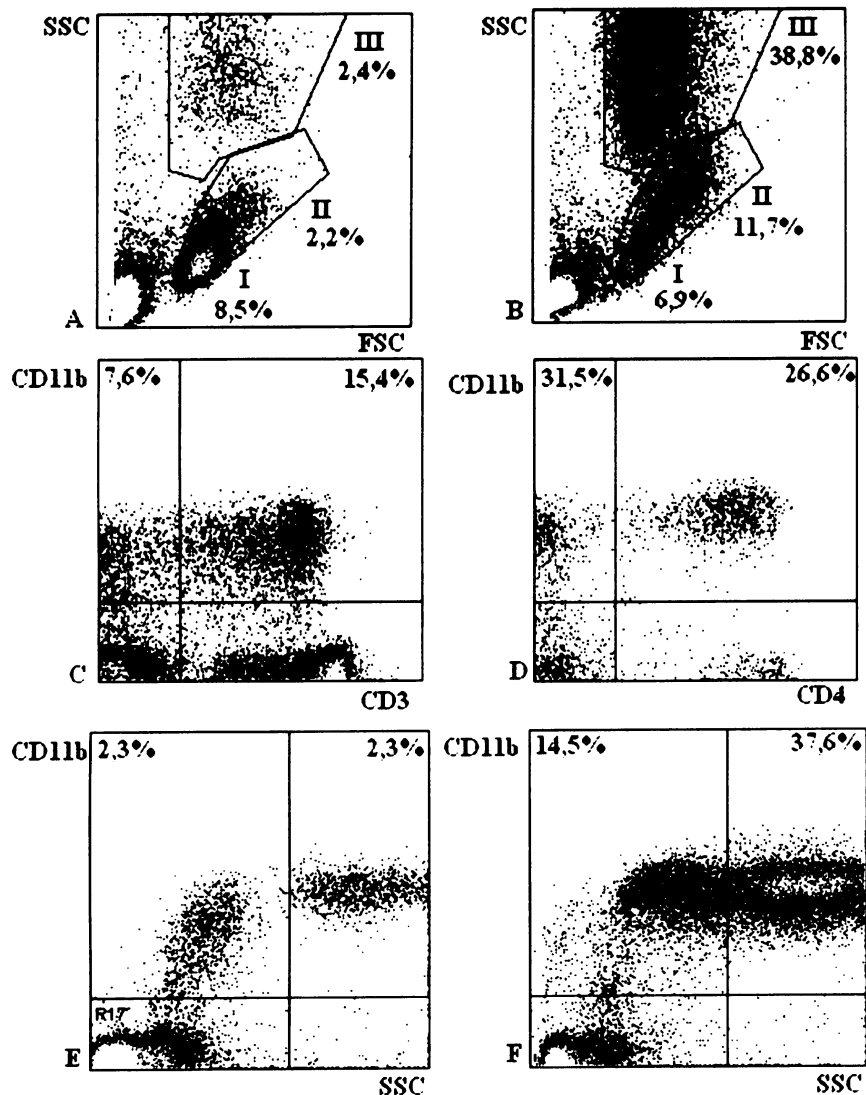


Fig. 3. Phenotyping of peripheral blood cells in healthy and R5-28 tumour-bearing rats in advanced stage of the disease. A highly increased number of granulocytes (III) and decreased amount of lymphocytes (I) is clearly visible in R5-28 tumour-bearing rat sample (B) compared to a healthy animal (A) at FSC/SSC parameter analyses. Moreover, the SSC^{med} cell population (II) is increased in R5-28 tumour-bearing rat. All these cells maintain the CD11b molecule on their surface. Approximately half to 2/3 of them are CD4⁺ in control rats (C). Contrary to that, CD4⁻ cells increase in number in tumour-bearing rats (D). CD11b-bearing cells differ between healthy (E) and R5-28 tumour-bearing rat (F). The number of CD11b-positive cells both SSC^{med} and SSChi are increased more than 10 times in R5-28 tumour-bearing rat.

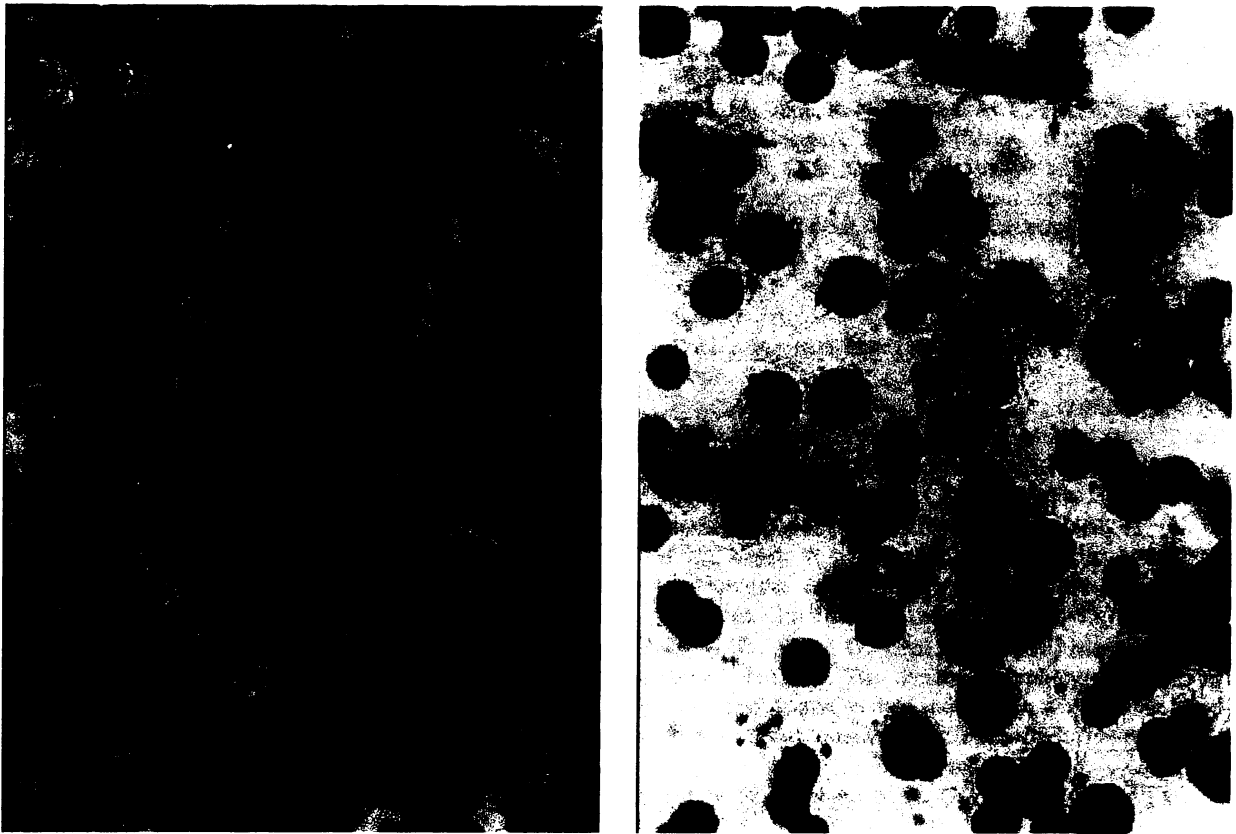


Fig. 4. A considerable increase of myeloid cells is clearly seen in blood smears of tumour-bearing animal (B) in comparison with a control rat (A).

regression suggests there may be some immunological memory. Although the rats developed small tumours after the first tumour cell application, absolutely no changes in the health status were observed after the second one. No R5-28 cell metastases were observed in experimental animals in all groups. This may signify that R5-28 cells have no or only low metastatic potential similar to that of K2 cells.

The inner part of both K2-derived and R5-28-derived tumours was necrotic. In the case of R5-28 tumours there were large cavities filled by fluid. Surprisingly, leukocytes were detected neither in tumours nor in the cavity fluid. Both K2 and R5-28 tumours form blood vessels mainly at their surface. The inner part of the tumour therefore has not enough nutrition and dies either by necrosis or apoptosis. On the other hand, this anatomic organization together with a compact character of tumour tissue may implicate worse accessibility of inner parts of the tumour for leukocytes. In any case, the same situation is generally known for other rapidly growing tumours in humans and animal models.

It is known that in a wide spectrum of solid tumours in mouse and in man, the number of immature myeloid cells (iMC) increases in peripheral blood and spleen (reviewed by Kusmartsev and Gabrilovich, 2005). These cells express CD11 and other myeloid markers

(Gr-1), but do not compose a uniform population. More likely, it is a mixture of myeloid cell populations in different stages of maturation. The composition of this mixture differs in various tumours. It is clear now that these cells are able to kill activated T cells and promote tumour growth.

Compared with these facts, our results fit with the data about myeloid cells both in K2- and R5-28-bearing rats. The composition of leukocyte population in peripheral blood was monitored during the whole experiment. Starting from the first macroscopic manifestation of tumours, a significant increase of CD11b⁺ myeloid cells was observed by flow cytometry. In blood smears, myeloid cells with high-segmented nuclei composed 50%–90% of all leukocytes in peripheral blood, dependent on tumour progression. The diameter of these cells was 10.5 μm , contrary to 9.3 μm in normal myeloid cells in control rats. That means a difference of about 10% of the cell size. However, this difference was not statistically significant, probably due to the low number of experimental and namely control animals and to the fact that myeloid cells compose only 20% of leukocytes in control rats. The bigger size of myeloid cells in tumour-bearing animals shows their activated status and may also represent lower differential stage of these cells.

A clearly visible vigorous increase of all CD11b-positive cells, either SSC^{hi} or SSC^{med}, was visible in flow cytometric analyses. At the same time the relative number of lymphocytes decreased dramatically. Detailed analysis shows that the population of cytotoxic CD4⁻CD8⁺ selectively subsided, while the number of CD4⁺CD8⁻ helper cells remained constant. It is in agreement with the data of Kustmartsev et al. (2004), who brought evidence that iMC could directly kill T cells, especially activated cytotoxic T lymphocytes. As was described above, peripheral myeloid cells in tumour-bearing rats can be divided into two groups according to the SSC parameter. The SSC^{med} population in healthy rats is composed mainly of CD4-positive cells, which are generally known as monocytes. This monocyte population makes more than 2/3 of all SSC^{med}CD11b⁺ cells; the remaining SSC^{med}CD11b⁺ cells are CD4⁻ in control rats. During the tumour progression the ratio between CD11b⁺CD4⁺ and CD11b⁺CD4⁻ changes and finally CD4-negative myeloid cells surpass CD4⁺ monocytes in peripheral blood. All these data point to the fact that this myeloid population is very heterogeneous and this heterogeneity increases during tumour disease. The exact composition of this population as well as R5-28 tumour factors, which lead to such pathological events, would be subject to further research.

Acknowledgements

Authors thank Jaroslava Sestakova and Miluse Hokesova for technical assistance.

References

- Alexander, K. R., Fishman, G. A., Swinfard, R. W., Misfeldt, M. L., Milam, A. H (1996) Sinclair swine with spontaneously regressing cutaneous melanomas do not have autoantibodies against retinal bipolar cells. *Exp. Eye Res.* **63**, 347–349.
- Ayyoub, M., Taub, R. N., Keohan, M. L., Hesdorffer, M., Mettetz, G., Memeo, L., Mansukhani, M., Hibshoosh, H., Hesdorffer, C. S., Valmori, D. (2004) The frequent expression of cancer/testis antigen provides opportunities for immunotherapeutic targeting of sarcoma. *Cancer Immun.* **4**, 7.
- Kusmartsev, S., Gabrilovich, D. I. (2005) Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, Jul 27; 1-9 [Epub ahead of print]
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., Gabrilovich, D. I. (2004) Antigen-specific inhibition of CD8⁺ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J. Immunol.* **172**, 989-999.
- Pokorna, E., Jordan, P. W., O'Neill, C. H., Zicha, D., Gilbert, C. S., Vesely, P. (1994) Actin cytoskeleton and motility in rat sarcoma cell populations with different metastatic potential. *Cell Motil. Cytoskeleton* **28**, 25-33.
- Pokorná, E., Zicha, D., Chaloupková, A., Matoušková, E., Veselý, P. (2003) Two dynamic morphotypes of sarcoma cells, asymmetric stellate and triangle with leading lamella, are related to malignancy. *Folia Biol. (Praha)* **49**, 33-39.
- Segal, N. H., Blachere, N. E., Guevara-Patino, J. A., Gallardo, H. F., Shiu, H. Y., Viale, A., Antonescu, C. R., Wolchok, J. D., Houghton, A. N. (2005) Identification of cancer-testis genes expressed by melanoma and soft sarcoma using bioinformatics. *Cancer Immun.* **5**, 2.
- Veselý, P., Chaloupková, A., Urbanec, P., Urbancová, H., Boháč, L., Krchňáková, E., Franc, F., Sprincl, L., Vousden, K., Moss, R., Heaysmann, J., Dilly, P. N. (1987) Patterns of *in vitro* behaviour characterizing cells of spontaneously metastasizing K2M rat sarcoma. *Folia Biol. (Praha)* **33**, 307–324.