

# ENTODERMA ÉS HÁMŐSSEJTEK

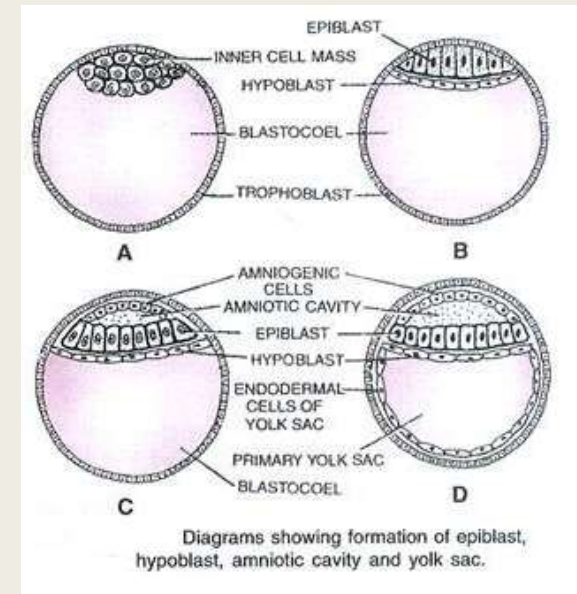
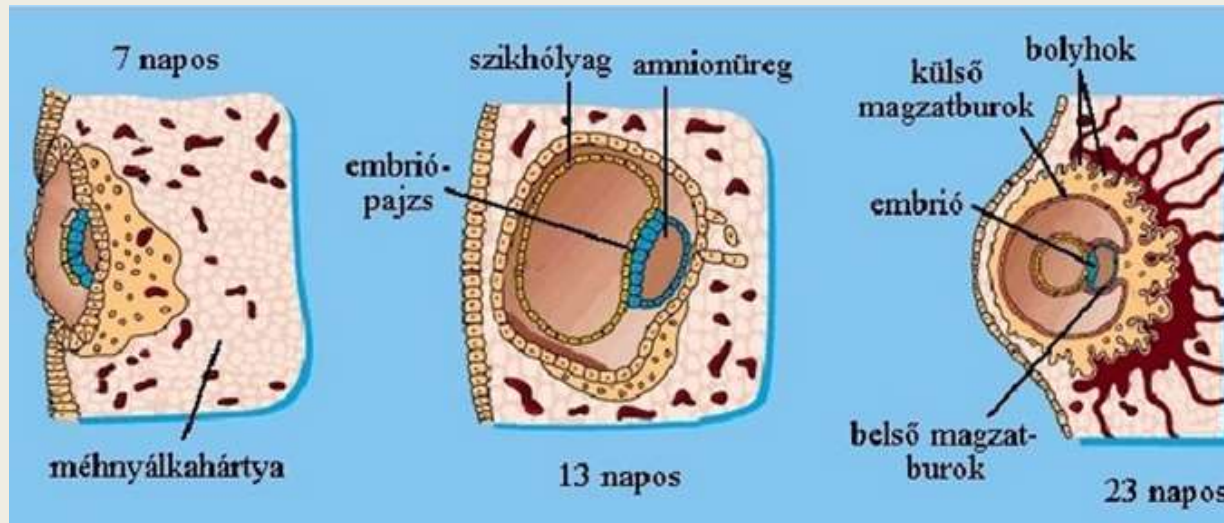
Dr. Bódi Ildikó

Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani  
Intézet

2019. November 20.

# Primer szövetek

# Let's start embryogenesis!



## Formation of Embryonic Disc:

We have seen that early blastocyst consists of inner cell mass and trophoblast. The inner cell mass contains cells called stem cells which have the potency to give rise to all tissues and organs. The cells of the inner cell mass differentiate into two layers around 8 days after fertilization, a hypoblast and epiblast.

The hypoblast (primitive endoderm) is a layer of columnar cells and epiblast (primitive ectoderm) is a layer of cuboidal cells. The cells of the hypoblast and epiblast together form a two layered embryonic disc.

## Formation of Amniotic Cavity:

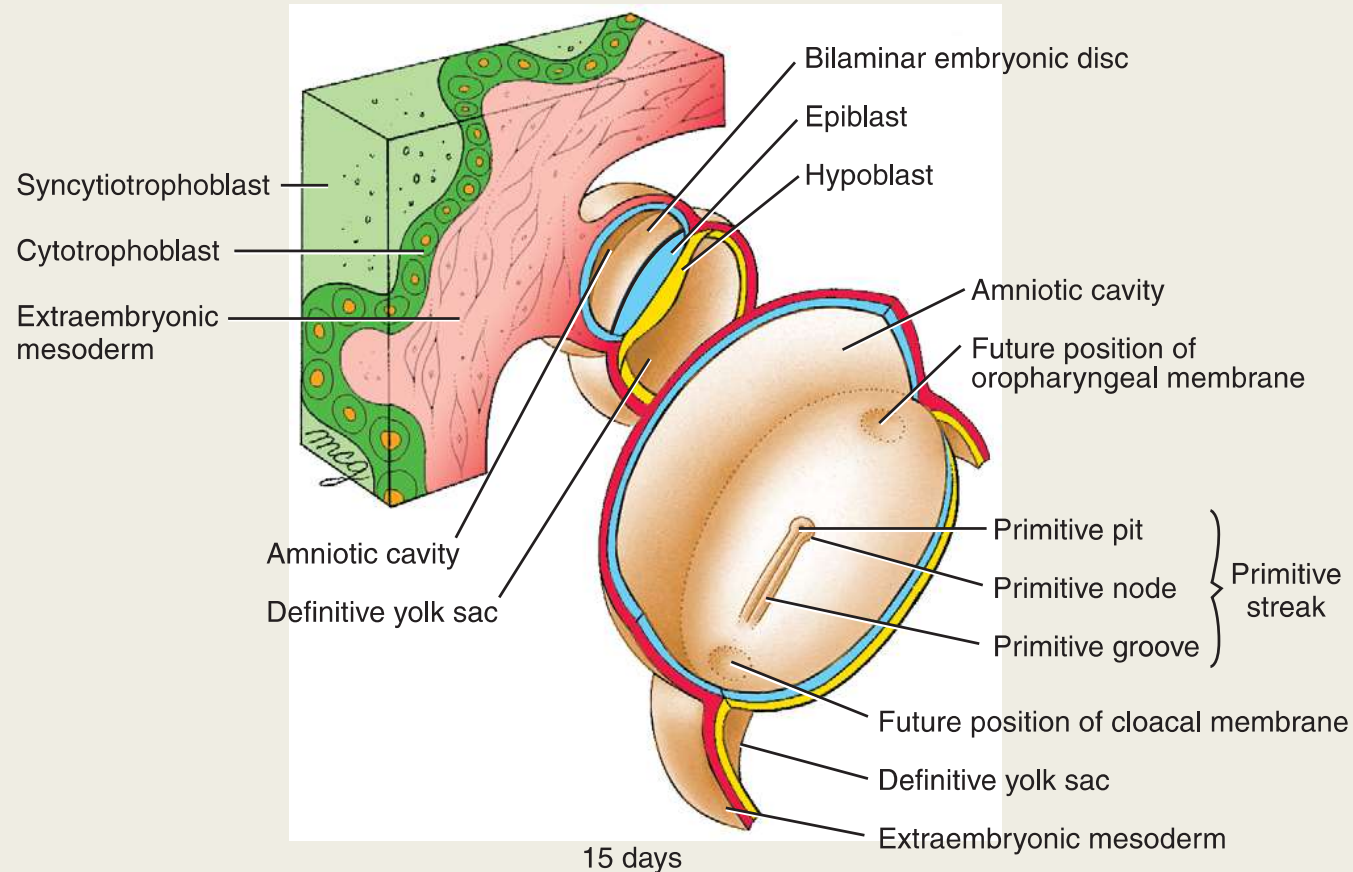
A space appears between epiblast and trophoblast, called amniotic cavity filled with amniotic fluid. The roof of this cavity is formed by amniogenic cells derived from the trophoblast, while its floor is formed by the epiblast.

- A blasztozisza stádium utáni embrió, a **két csíralemezes embrió** gyakorlatilag **két hámsejtrétegből** áll: a dorzálisan levő, egyrétegű hengerhám jellegű epiblasztból és a ventrálisan levő egyrétegű laphám szerű hipoblasztból. Vagyis a legkorábbi embrionális szövettípus a **hám**.
- A **gasztrulációval** jelenik meg a korai embrió másik fontos szövettípusa: a **mesenchyma**.
- A **három csíralemezes** embriót (csírákorong) az epiblaszt/ektoderma **hengerhámsejtrétege**, alatta a gasztrulációnál kivándorolt mezoderma **kötőszöveti jellegű** sejtjei és legalul az endoderma egyrétegű **laphámja** alkotja.
- Még hosszú ideig az embrióban ezt a **kétféle**, viszonylag kevésbé differenciálódott **szövettípust** találjuk: a **hámot** és a legkorábbi **kötőszövetet**.

***"It is not birth, marriage, or death, but gastrulation, which is truly the most important time in your life."***

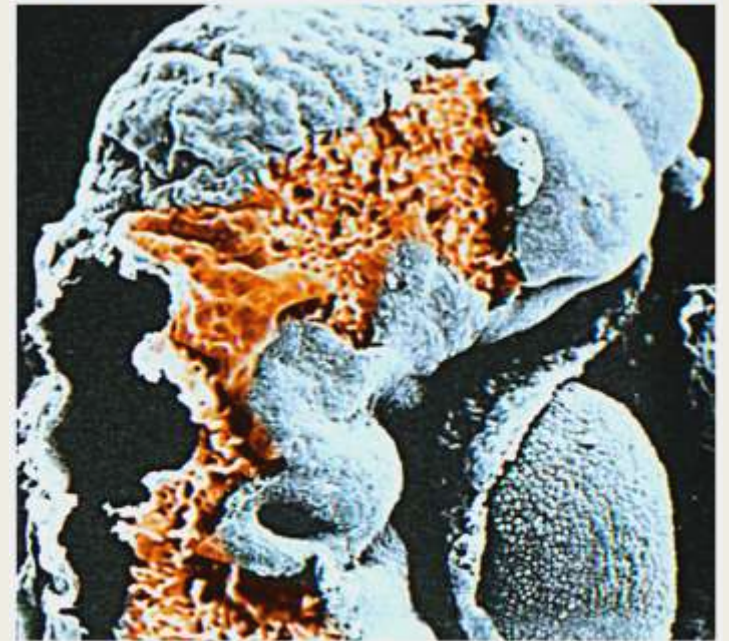
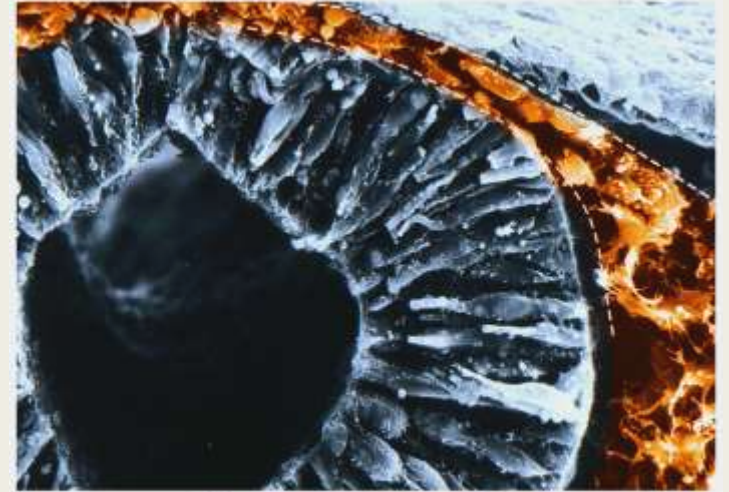
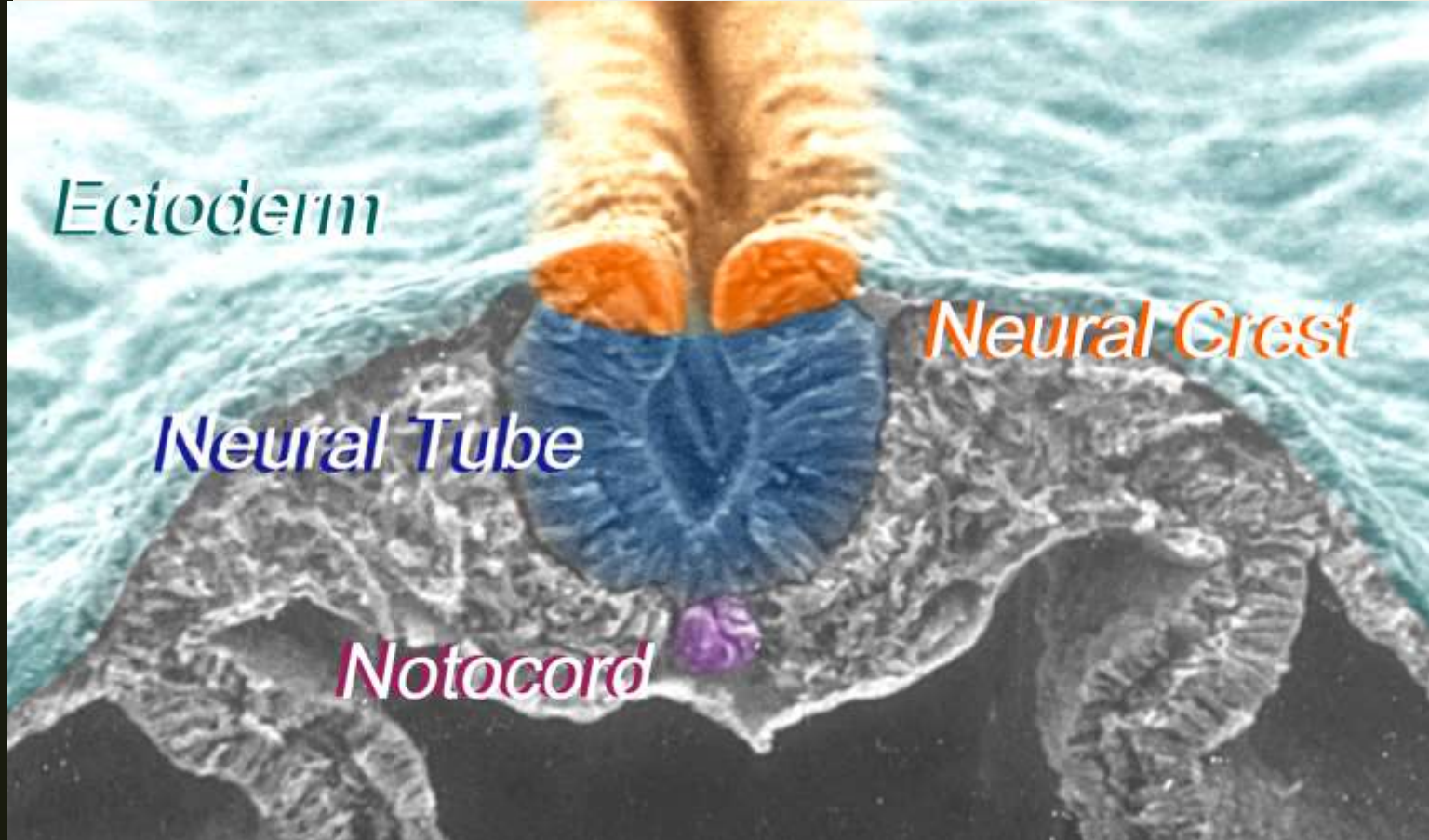
Lewis Wolpert

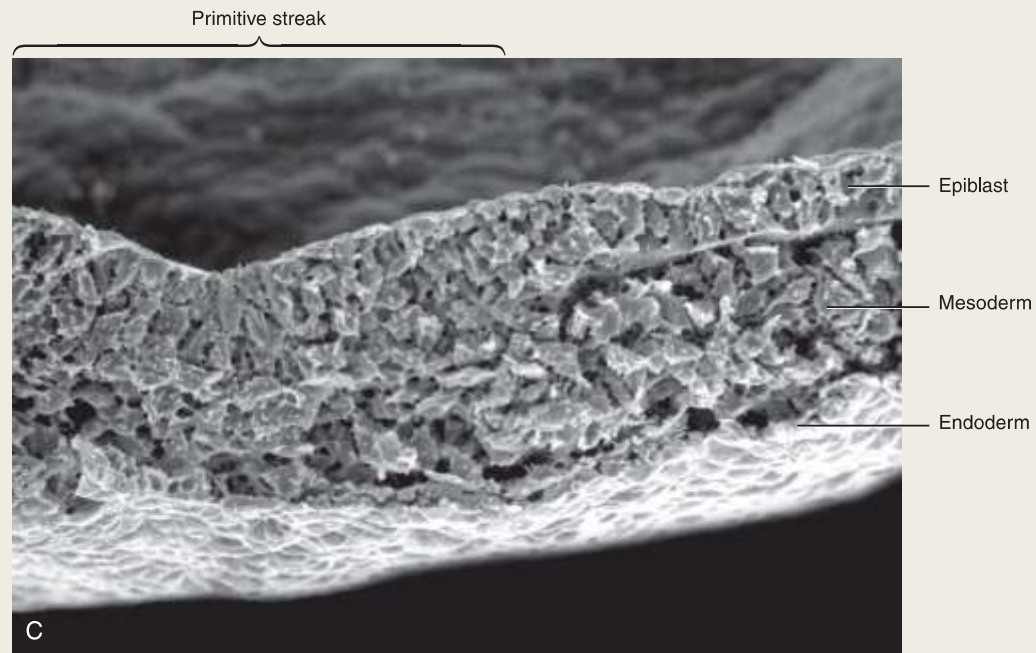
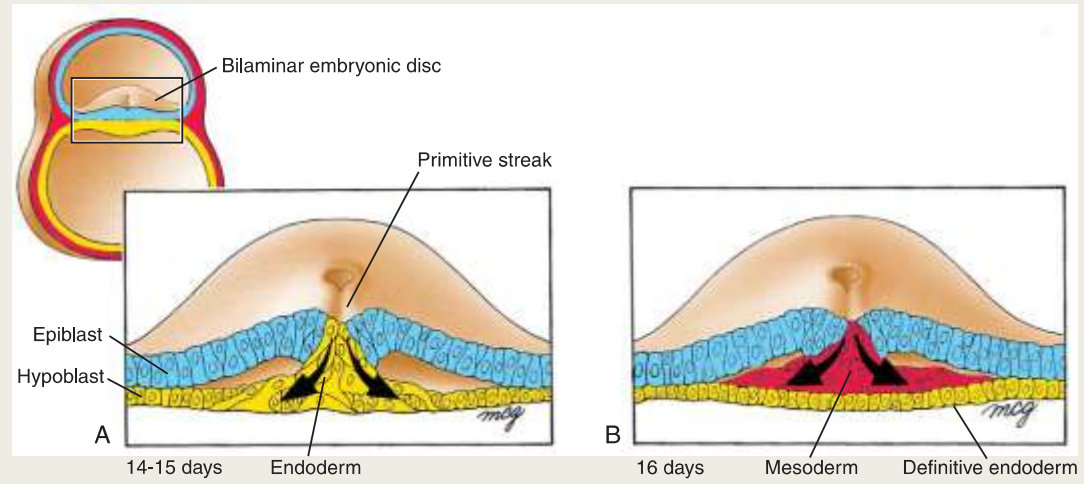
(1986)



**Figure 3-1.** View of dorsal surface of bilaminar embryonic disc through sectioned amnion and yolk sac. Inset at upper left shows relation of the embryo to the wall of the chorionic cavity. The primitive streak, now 1 day old, occupies 50% of the length of the embryonic disc. The future positions of oropharyngeal and cloacal membranes are indicated.







**Figure 3-6.** Embryonic discs sectioned through the region of primitive streak, showing ingress of epiblast cells during gastrulation. *A*, On days 14 and 15, ingressing epiblast cells displace hypoblast and form definitive endoderm. *B*, Epiblast that ingresses on day 16 migrates between endoderm and epiblast layers to form intraembryonic mesoderm. *C*, Scanning electron micrograph of a cross section through the chick primitive streak.

# Elsődleges szövetek

- Az embriónak ezt a **legkorábbi kötőszövetét** nevezzük **mesenchymának**. Ezt a kifejezést olyan korai (kb. az embrionális kor végéig, azaz max. a 2. hónap végéig) szövetre alkalmazzuk, amelynek a sejtjei nyúlványosak, önállóak (nem képeznek hámkötéléket), ECM-be ágyazottak, aktívan migrálnak és **nagyon sokféle irányba tudnak differenciálódni (pluripotencia)**. Ezekből a mesenchymasejtekből nemcsak későbbi kötőszövetek, de támasztószövetek (csont, porc), zsírszövetek, izomszövetek lesznek.
- A mesenchyma kifejezés elsősorban **alaki és differenciálódási** tulajdonságra utal (l. fent), nem pedig arra, hogy melyik csíralemezből származik: a mesenchyma általában a mezoderma származéka, de nem mindig! Mesenchymasejtek származnak a dúclécből is.
- Fordítva: a mezoderma nem csak mesenchymát hoz létre, hanem hámokat is, pl. a vesék hámjait.
- Ergo: a mesenchyma és a mezoderma nem szinonimák!

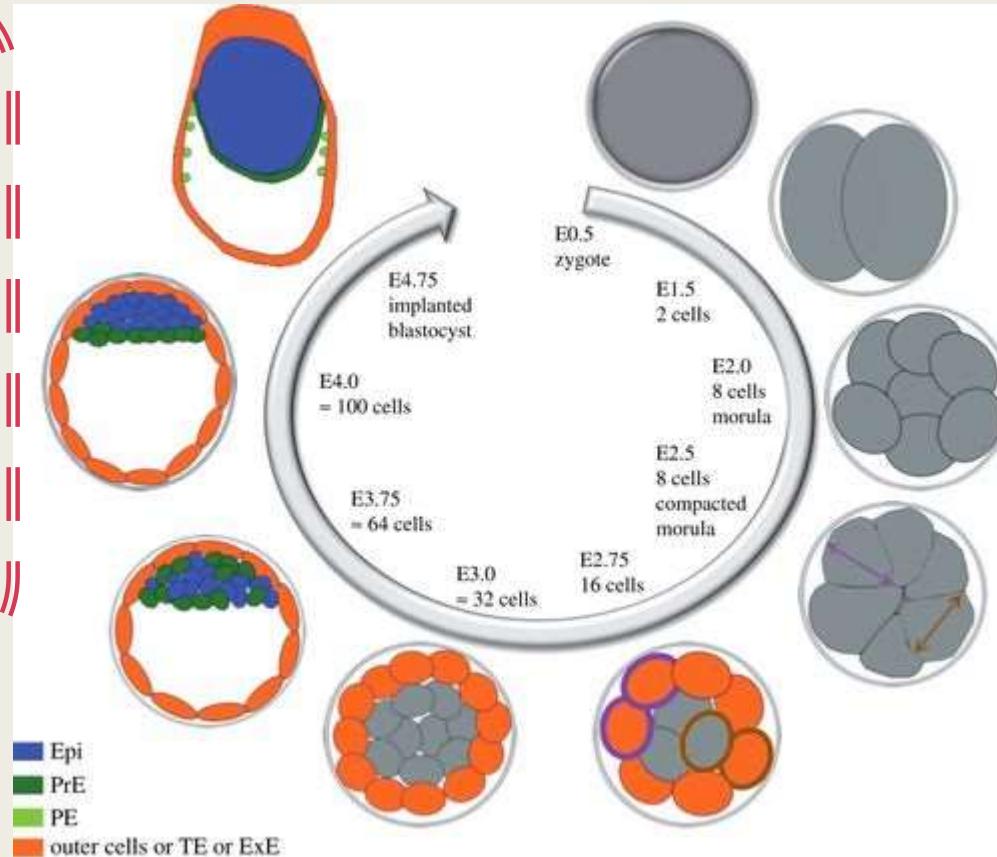


# Elsődleges szövetek egymásba alakulása

- A legelső szövettípus az embrióban tehát a hám.
- Ebből a gasztruláció során vándorolnak ki a mesenchymasejtek.
- A gasztrulációnál tehát a hámsejtek elvesztik a hám jellegű tulajdonságaikat (szorosán kapcsolódó sejtek: sejt-sejt kapcsoló struktúrákkal, nincs közöttük ECM, nem migráló fenotípus) és mobilis, individuális, ECM-et termelő, egymással nem kapcsolódó sejtekké alakulnak.
- Ezt a folyamatot **epithelio-mesenchymális átalakulásnak** (epithelio-mesenchymal transformation), **EMT**-nek nevezzük.
- A korai embrióban **nem ritka az EMT**: nemcsak a gasztruláció egy EMT, de a dúclécsejtek kivándorlása az ektodermából (l. neuruláció), vagy a szomitákból (hám jellegű szomitabla) történő szklerotomsejt-, miotomsejt-, dermatomsejt-kivándorlás is.
- Máskor ennek a folyamatnak a **fordítottja** figyelhető meg: nyúlványos, migráló sejtek hámmá alakulnak: mesenchymális-epitheliális transzformáció, **MET**. Ezt majd a vese fejlődésénél fogjuk látni.

# The core molecular regulatory network for primitive endoderm versus epiblast cell specification

The early ICM progenitors co-express Nanog and Gata6 before acquiring distinct identities cell by cell.



Epi and PrE cells specify within the ICM in an apparent random salt and pepper pattern.

expression of Nanog and Gata6 depends on FGF4 expression

the Erk pathway inhibits PrE specification while promoting Epi identity, visualized by Nanog expression in all ICM cells

FGF4 administration induces PrE cells, at the expense of the Epi cells. The ICM precursor has a binary fate choice, which is dependent on low or high Erk activity leading either to an Epi or to a PrE identity, respectively.

Grabarek *et al.* showed that plasticity is lost in all ICM cells only after the late blastocyst stage.

the expression of Nanog and Gata6 in an exclusive manner is not sufficient to lock the cell identity

## *Nanog* requirements for epiblast specification

A *Nanog*-nak alapvető szerepe van az epiblast differenciálódásában

Indeed, in *Nanog*<sup>-/-</sup> embryos, all ICM cells express *Gata6*. This also confirms that *Nanog* represses *Gata6* expression *in vivo*.

The ICM marker *Oct4* and the trophectoderm marker *Cdx2* are correctly expressed in these mutants, demonstrating that cell specification between ICM and trophectoderm occurs properly.

*Fgf4* was shown to be expressed specifically in Epi precursor cells of wild-type embryos



# *Gata6* szükséges a primitív endoderma differenciálódásához

|| *Gata6* mutáns hám őssejtek még retinsav jelenlétében sem képesek primitív endodermává differenciálódni

|| *Gata6* szükséges a primitív endoderma differenciálódásához

|| Fgf4 és Nanog mutáns embriókban kimutatták, hogy a *Gata6* expresszió nem függ az Fgf4 jelenlététől

- Annak ellenére, hogy az Oct4 hatással van a hám őssejtek pluripotenciájára, az Oct4 mutáns embriók megfelelő arányban termelnek Epiblast (Epi) és Pre Epithel (PrE) sejteket

•

Ez arra utal, hogy az Oct4 nélkülözhetetlen az Epi és a PrE specifikációhoz.

•

Az RTK-útvonal nem befolyásolja az ICM (inner cell mass) -sejt specifikációját az emberi embriókban, míg a Nanog és a Gata6 salt and pepper expressziója jelen van

- A Bmp4 valóban kifejezetten az Epi prekurzorokban expresszálódik az E3.5-nél [15], és szerepet játszik az extraembrionális endodermák vonalának differenciálódásában, valószínűleg már a PrE kialakulásakor az embrioid testekben

Fgf4 dinamikus expressziója a preimplantáció során:

Koncentrációja 2 sejtes állapotban a legmagasabb, majd a salt and pappern mintázat kialakítása után, fokozatosan csökken. Csak az epiblast sejtekben mutat magas koncentrációt

# Primitív endoderma differenciáció

Az epiblast sejtké Fgf4 általi aktiválásra van szükség, amit a Nanog irányít.

Az Fgf4 nem képes önmagában aktiválni a Sox17-et és a Gata4-et Gata6 hiányában

Oct4-deleted embriókban nincs Fgf4 expresszió

Az Fgf4 expresszió után az epiblast sejtekből kialakulnak a primitív endoderma sejtek, melyek az belső sejtcsoporthoz kapcsolódva érintkeznek a blastocoel üregével

Mielőtt még “kiválnának” az epiblast sejtekből el kezdik expresszálni a Gata6, Sox17, Serpinh1, Laminin1-et, amit a Gata4, Lrp2, Pdgfra, Col4a expressziója követ



## Cell sorting mechanisms and epithelium formation

A kadherineket eltávolítása nem akadályozta meg a sejtek szortírozását, amikor a sejteket elsősorban retinsavval kezelték, amelyet a primer epithel differenciálódás alapjául használtak.

Az Oct4 inaktiválása hibás sejt sorting-hoz vezet, így a Dab2 vagy az  $\alpha$ -fetoprotein-t expresszáló sejtek egy csomóban maradnak

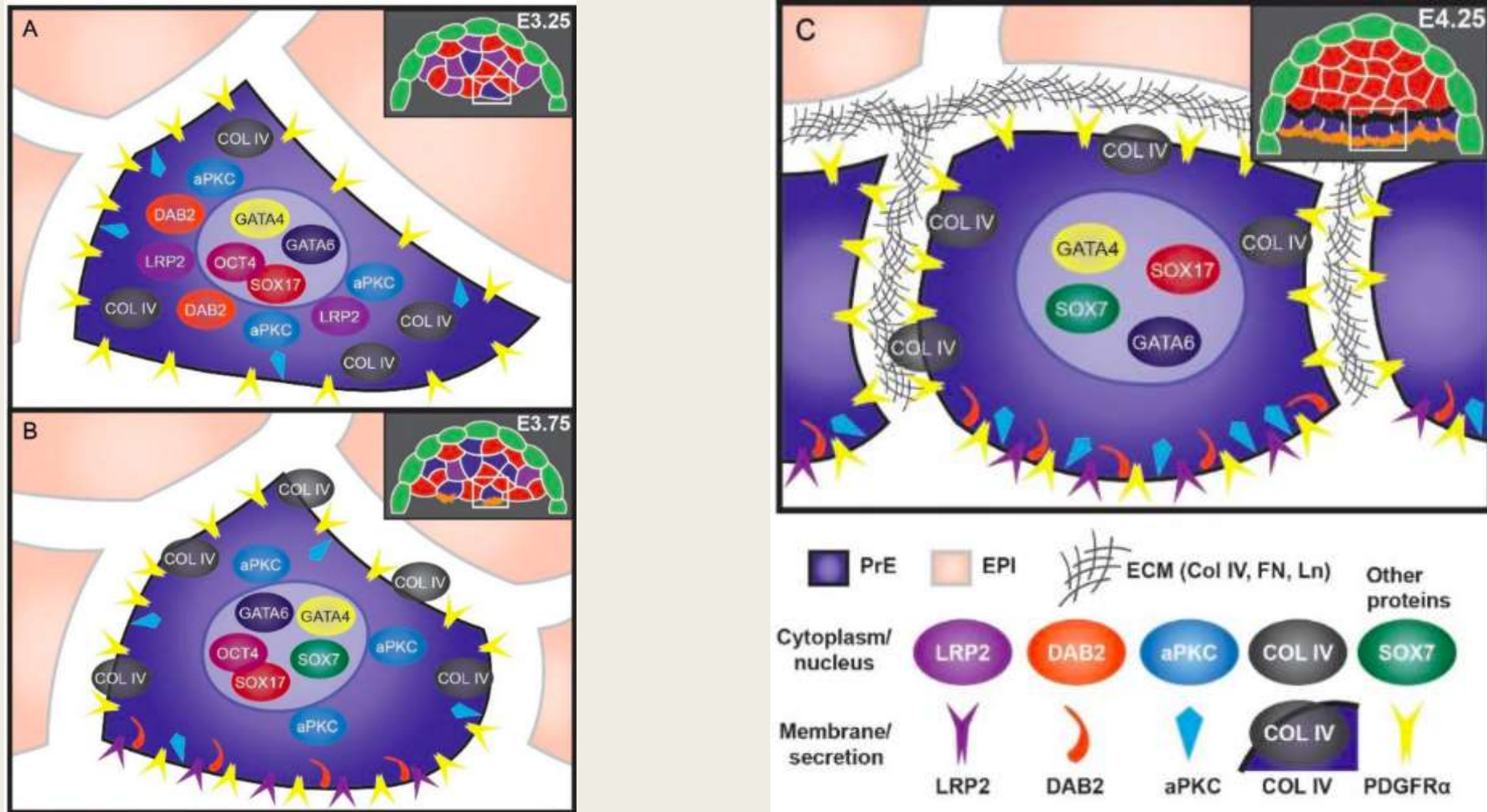
Az embrionális fejlődés 4,5 napján a primitív endoderma sejtjeiben magas koncentrációban expresszálódik az atipikus protein kináz C, melynek hiányában az epithelium kialakulásában defektus lép fel.

Protein kináz C gátlása során a Gata4 nem a magban, hanem a citoplazmában fog expresszálódni.

Habár a Gata4 deficiens embriók túlélnek ezt az állapotot, a későbbiekben elpusztulnak a rossz implantáció miatt.

A PKC és az integrin útvonalak egymás közötti potenciális kölcsönhatásai feltétele annak, hogy kialakuljanak az epithelialis polaritások

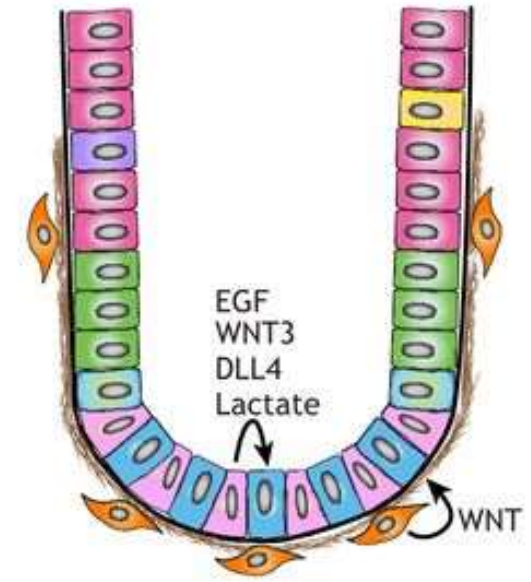
Sox17 szerepe az epithelium fenntartásában



**Fig. 3** (A) Before E3.75, some PrE cells are already situated at the ICM surface and express specific markers but are not polarized yet. (B) Around E3.75, PrE cells that have emerged to the surface start to be polarized, evidenced by DAB2 and LRP2 localized in the future apical membrane that faces the blastocoel cavity. SOX7 is now expressed within the nucleus of these cells. It is not clear if COLIV is already secreted by then or at the next step. (C) At E4.25, sorting is completed as all PrE cells have arisen at the surface, and start to form a structured epithelium with a basolateral extracellular matrix (ECM), and an apical pole labeled by LRP2, DAB2, and now aPKC.

# Stem cells drive dynamic tissue turnover in epithelia

A Small intestine



**Key**

Enterocyte	Enteroendocrine cell	Goblet cell
Transit-amplifying cell	Paneth cell	LGR5+ ISC
+4 stem cell	Mesenchymal cell	Extracellular matrix
Basement membrane		

the intestinal epithelium is one of the fastest self-renewing tissues and completely regenerates within 3-5 days

**B Skin**

Diagram illustrating the skin hair follicle cycle. The infundibulum contains IFE stem cells. The isthmus contains HFSCs. The bulge contains secondary hair germs. The dermal papilla contains WNT signaling. Other structures include sebaceous glands and dermal papillae.

**Key**

HFSC	IFE stem cell	Progenitor
Secondary hair germ	Sebocyte	Mesenchymal cell
Extracellular matrix	Treg	Basement membrane

**C Airway**

Diagram illustrating the airway basal stem cell niche. Basal stem cells (JAG2) and neuroendocrine cells (WNT) are shown. Other cells include ciliated and secretory cells.

**Key**

Ciliated cell	Secretory cell	Neuroendocrine cell
Basal stem cell	Mesenchymal cell	Basement membrane
Extracellular matrix		

these stem cells migrate out of their niche, they differentiate either into the absorptive or secretory lineages and finally into one of four differentiated cell types: enterocytes, mucin-secreting goblet cells, peptide hormone-secreting neuroendocrine cells and microbicide-secreting Paneth cells

It has been shown that co-culturing LGR5<sup>+</sup> ISCs with a Paneth cell-enriched population or adding exogenous WNT3A, enhances the efficiency of LGR5<sup>+</sup> ISCs in forming differentiated intestinal organoids *in vitro*

Paneth cells play a role in immunity and host-defense, but also secrete important signaling molecules such as WNT3, EGF and Notch ligand DLL4, suggesting that they might signal to ISCs. In line with this, it has been shown that co-culturing LGR5<sup>+</sup> ISCs with a Paneth cell-enriched population or adding exogenous WNT3A, enhances the efficiency of LGR5<sup>+</sup> ISCs in forming differentiated intestinal organoids *in vitro*

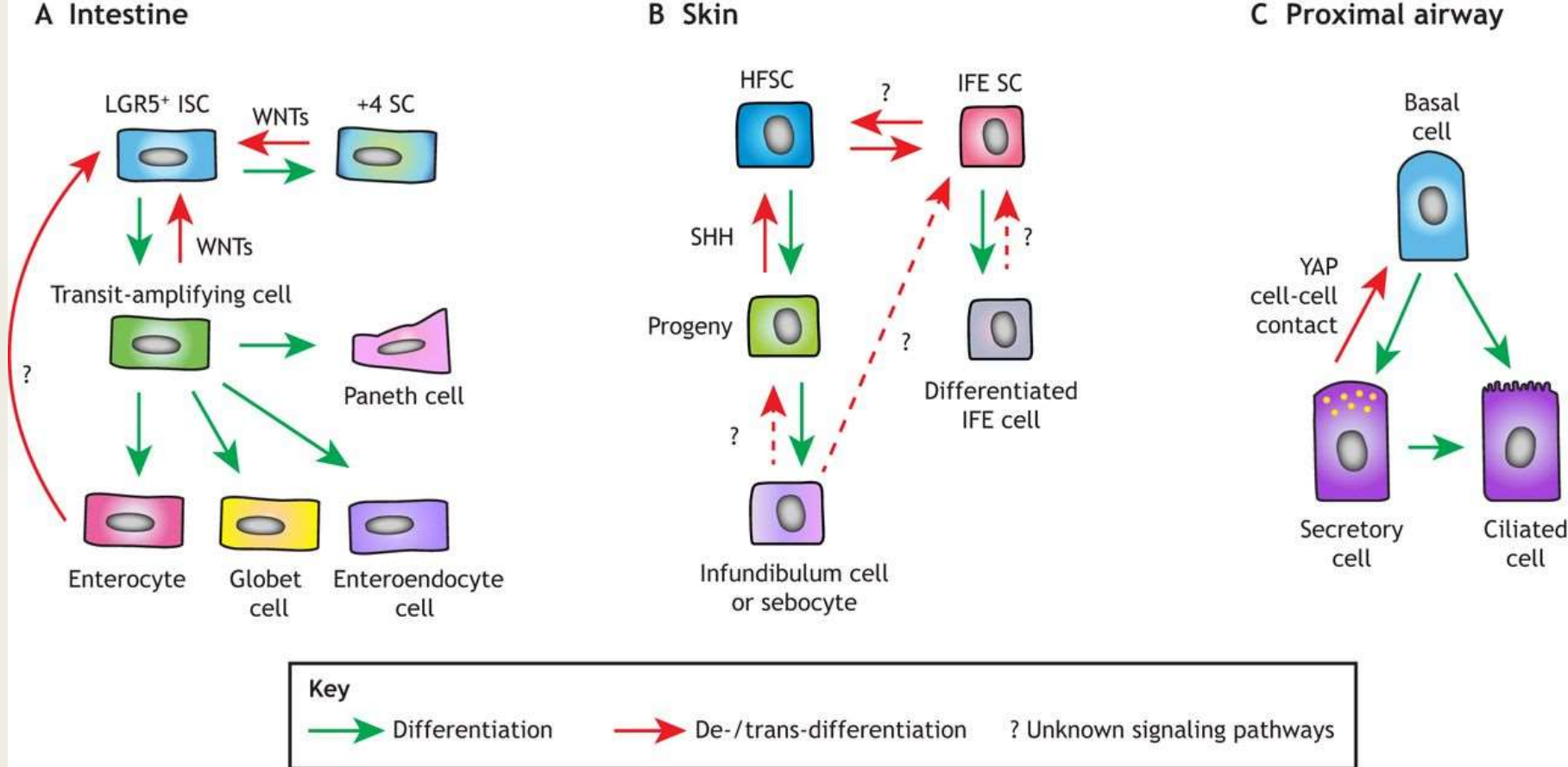
depletion of Paneth cells *in vivo* using three different genetic mouse models leads to reduced stem cell numbers indicating that daughter cells of LGR5<sup>+</sup> ISCs provide essential niche signals for these stem cells.

Deletion of epithelial *Wnt3*, although necessary for organoid cultures, has no effect on stem cell function in adult mice, as stromal secretion of WNTs could fully support intestinal homeostasis

Interestingly, WNT alone is not sufficient to promote LGR5<sup>+</sup> ISC self-renewal, but additional signals from R-spondins are required. WNT stabilizes R-spondin receptor expression (LGR4, LGR5, LGR6), enabling R-spondin to drive stem cell expansion

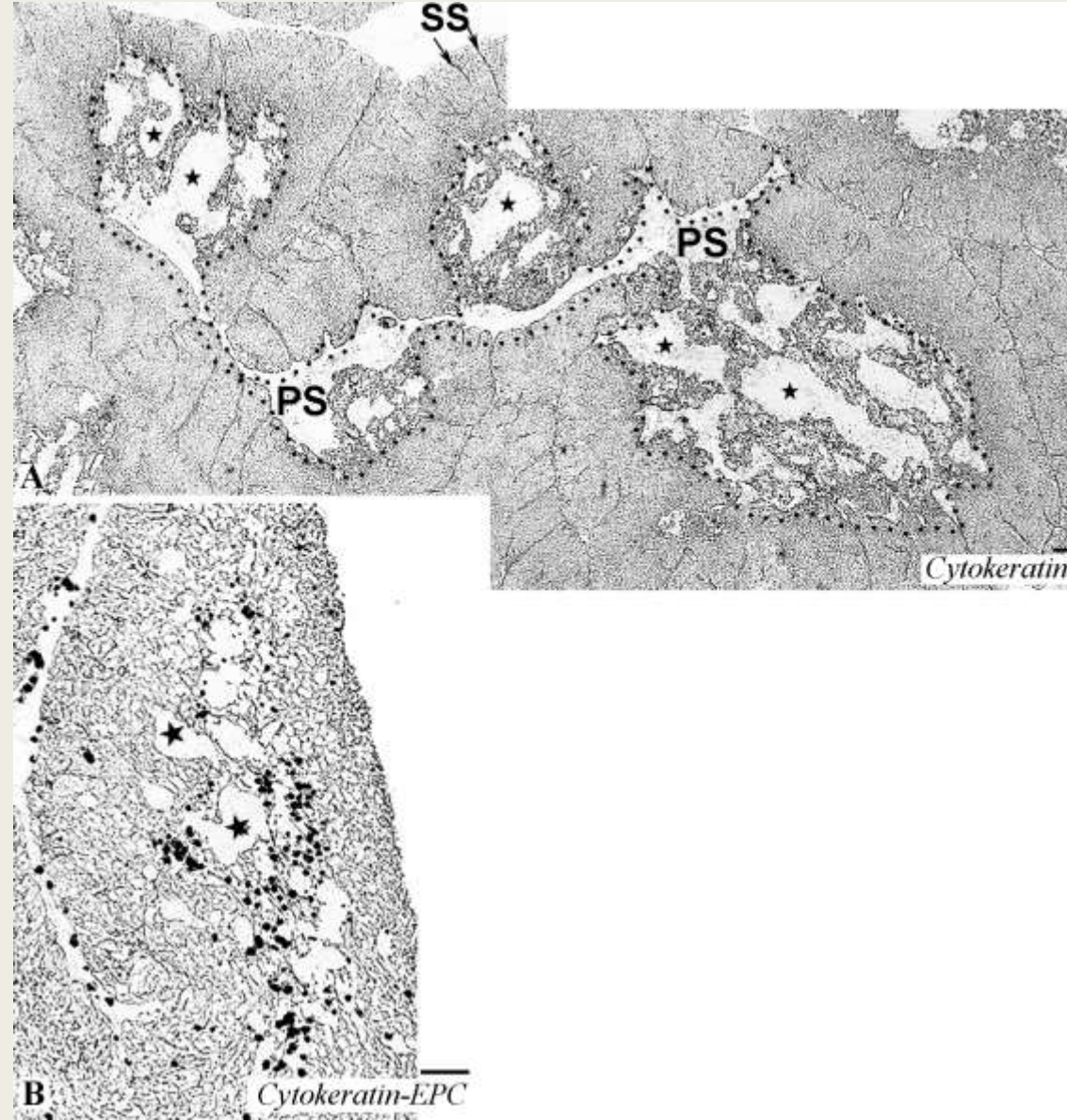


Collectively this indicates that Paneth cells are a dispensable source of WNT *in vivo*, and thus the outcome of Paneth cell depletion might be dependent on the approach used and its indirect impact on the WNT signaling status of the niche



**Niche-controlled differentiation trajectories and plasticity in epithelia.** (A) In the intestine, progenitors and also enterocytes can dedifferentiate to LGR5<sup>+</sup> intestinal stem cells (ISCs) through WNT-mediated niche signals. (B) In the skin, the immediate progeny of hair follicle stem cells (HFSCs) as well as more distant populations located in the interfollicular epidermis (IFE), infundibulum and sebaceous glands can repopulate the bulge stem cell niche upon HFSC loss. The precise signals that control this plasticity are unclear but *in vitro* studies implicate sonic hedgehog (SHH) signaling in this process. In response to wounding, HFSCs are able to migrate into the IFE to regenerate the epidermis and, vice versa, IFE stem cells can generate hair follicles upon transplantation. Although experimental evidence for many dedifferentiation events is compelling (solid arrows) for others it is preliminary (broken arrows). (C) In the lung proximal airway epithelium, secretory cells can dedifferentiate into basal cells through signals that involve direct cell-cell

Az epithel sejtekre jellemző KIF (keratin intermedier filamentum) proteinek közül megkülönböztetünk savas (I.típus: K9-K23) és bázikus (II.típus: K1-K8 és K71-K80) csoportot (Odaka és mtsai 2013). A KIF-ok megjelenési formái egy adott sejtvonál jellemző indikátorai lehetnek.

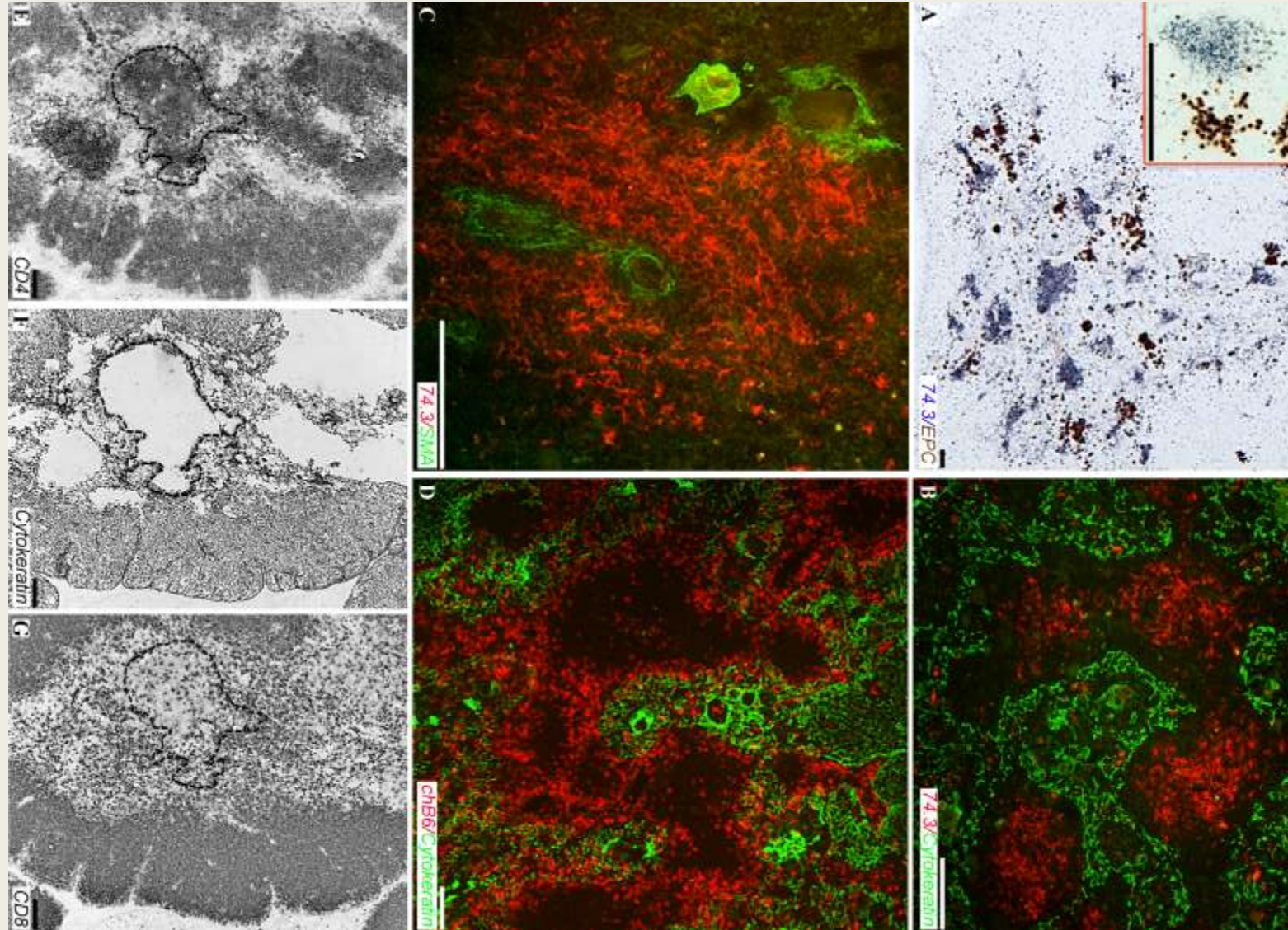


A Thymus epithel sejtek (TEC) fenotípusát és funkcióját figyelembe véve megkülönböztetünk cTEC-eket (kérgi) és mTEC-eket (velő). Az egér cTEC-ekben K8 és K18 expresszálódik, míg a velőállományban kétféle mTEC-ek populációról számoltak be:

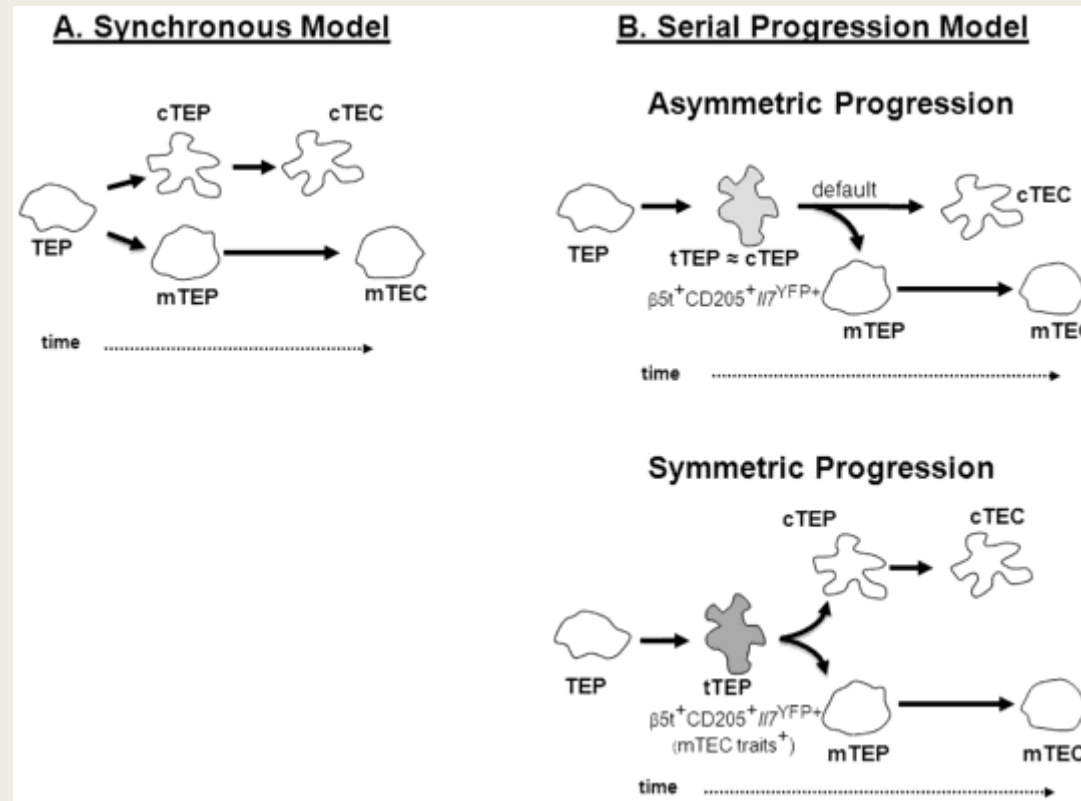
1. a nagyobb számban előforduló **K5<sup>+</sup>K14<sup>+</sup> csillag** alakú sejtek csoportja, melyek **Ia<sup>+</sup>** (MHCII) és
2. **K8<sup>+</sup> kerek** morfológiájú populáció, melyek **Ia<sup>-</sup>** (Farr és Anderson 1985; Klug és mtsai 1998; Surh és mtsai 1992; Lee és mtsai 2011; Odaka és mtsai 2013).



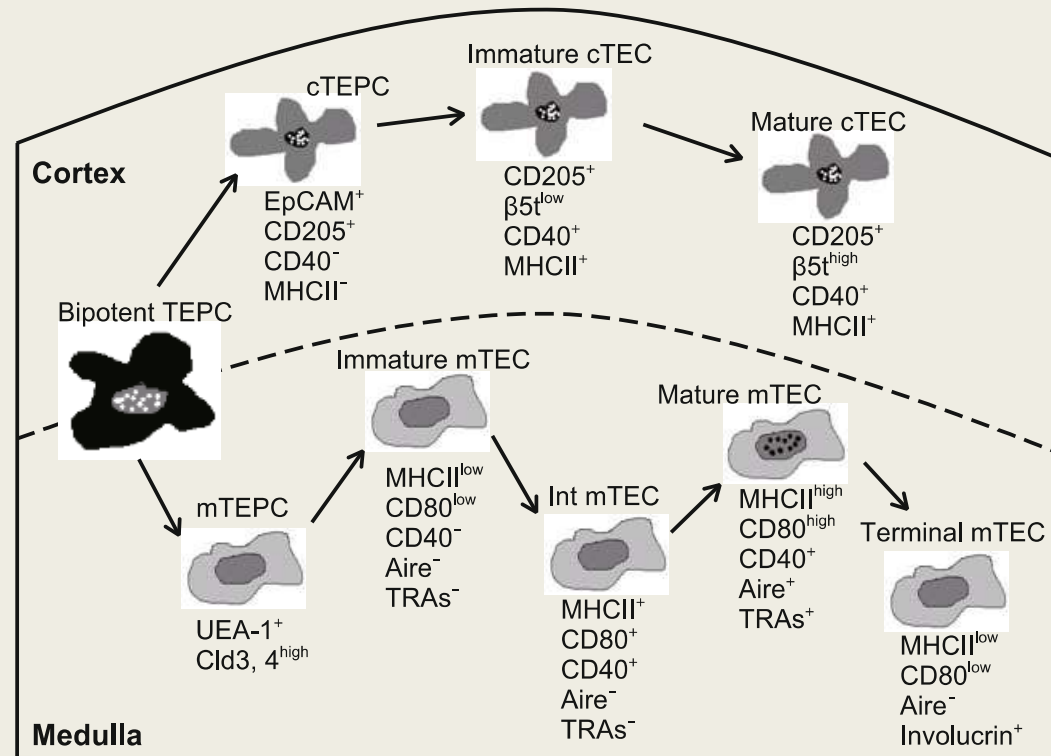
A TEC-ek fejlődéséhez nem csak a hámsejt-hámsejt, illetve hám-mesenchyma interakció szükséges, de a T-sejt-hámsejt szoros kapcsolata is lételem a TEC-ek differenciálódásának. Minden olyan esetben, ahol a thymocyták érése blokkolva van (Rodewald 2008), a TEPC-ek nem képesek befejezni differenciációs programjukat. A kéregvelő kompartmentalizáció zavart szenved.







*Thymus hámsejtek fejlődési útvonalai I.* (A) A szinkron elmélet szerint a thymus epithel progenitor (TEP)-ből időben egyszerre differenciálódik a cTEC-ek és a mTEC-ek progenitora is, vagyis a cTEP és a mTEP is. (B) A “serial progression” fejlődési útvonal esetén a TEP-ből elsőként kialakul egy átmeneti közös progenitor (tTEP), mely továbbfejlődik az adott sejtvonalra jellemző progenitorokon (cTEP és mTEP) keresztül cTEC-ekké és mTEC-ekké. Az asszimétrikus modellben szereplő tTEP fenotípusa sokkal közelebb áll a cTEP fenotípusához, azonban bipotenciájukat elveszítve, ezekből a progenitorokból csak mTEC-ek képződhetnek. A cTEC-ek kialakulása ez esetben valamilyen deformitás eredménye lehet. A szimmetrikus modellben szereplő tTEP a kérgi és a velő hámsejtek sejtvonalára jellemző molekulákat expresszálják. A fejlődés további lépései megegyeznek a szinkron elméletben leírtakkal, vagyis a cTEP-ből a cTEC-ek, míg a mTEP-ből a mTEC-ek alakulnak



*Thymus hámsejtek fejlődési útvonalai II.* A cTEC-ek és a mTEC-ek is a közös bipotens TEPC-ből indulnak el a fejlődés útján. A differenciálódás során kialakulnak a mindkét sejtvonalra jellemző progenitorok (cTEPC és mTEPC). A különböző érési stádiumban lévő sejteket a sejtfelszíni molekulák expressziója alapján lehet megkülönböztetni. A cTEC-ek fejlődésére az EpCAM, a CD205, a CD40, az MHCII és a β5t molekulák különböző mértékű expressziója jellemző. Ezek alapján megkülönböztetünk éretlen és érett cTEC-eket. A mTEC-ek érése több lépésen keresztül zajlik: az Ulex Europaeus Agglutinin-1 (UEA-1) és Claudin3, 4 pozitív mTEPC-ből az éretlen mTEC differenciálódik. Az MHCII, a CD80 és a CD40 molekulák expressziójának fokozódása következtében egy intermediér mTEC-en keresztül érett (mature) mTEC-ek alakulnak ki, melyek az AIRE mediálta TRA-eket termelik. Az érési folyamat végső fázisaként az érett mTEC-ek terminális állapotba lépnek, elveszítve az AIRE pozitivitásukat, illetve az MHCII és a CD80 molekulák expressziójának mértéke is csökken. A terminális mTEC-ek involucrint kezdenek el produkálni, ezzel is jelezve funkciójuk elvesztését. Alexandropoulos és Danzl 2012 nyomán.

## A hám őssejtjeinek további jellemzése

A folyamatosan megújuló szövetek őssejtjeiről feltételezik, hogy elvben végtelen számú sejtosztódás lehetőségével bírnak, ugyanakkor fiziológias körülmények között alig osztódnak (Lajtha, 1979). Tenyésztési körülmények között a hámsejtek osztódási kapacitása, bár igen nagy, mégis véges. Ugyanakkor az élő hámszövet őssejtjeinek még a véges osztódási kapacitását sem bizonyították. Számos adat szól amellett, hogy az őssejttulajdonság megtartásához a sejt közvetlen környezetéből folyamatosan kapott megfelelő jelek szükségesek

Úgy tûnik, hogy az epidermális õssejtpopuláció fenntartásában a bazális hámsejteknek az alattuk elhelyezkedõ membránhoz történõ tapadása alapvetõ jelentõséggel bír. A membránt alkotó fehérjék a sejtek béta1 integrin receptoraival kapcsolódva a mitogén által aktivált protein kinázon (MAPK) keresztül mint jelátviteli úton szabályozzák az epidermális õssejtpopuláció fenntartását (Zhu et al., 1999).

A béta1 integrin esszenciális szerepet játszik a hámszövet és a szőrtüsző normális kialakításában is. A béta1 integrin hámsejtekben való kiütése egérben a szőrtüsző és a közötte elhelyezkedő hámszövet súlyos rendellenességeit eredményezi (Brakebusch et al., 2000; Raghavan et al., 2000). A feltehetően korlátlan szaporodóképességgel rendelkező sejtekben (ősivarsejt, embrionális sejtek, immortalizált és tumorsejtek) a telomeráz enzim megakadályozza a kromoszómavégek rövidülését. Érett, egészséges szervezetben az ivarsejteken kívül csontvelőből, köldökzsinór- és perifériás vérből származó sejtekben (csontvelői őssejtek), valamint a hám bazális sejtjeiben tudtak telomeráz aktivitást kimutatni (Härle-Bachor-Boukamp, 1996).



Felhasznált irodalom:

**Cell fate in mammalian development:**

Primitive endoderm differentiation: from Specification to Epithelialization - Bassalert et al. 2018

**The birth of embryonic pluripotency** - [Thorsten Boroviak](#) and [Jennifer Nichols](#) 2014

**From pluripotency to differentiation: laying foundations for the body pattern in the mouse embryo**  
- [Magdalena Zernicka-Goetz](#) and [Anna-Katerina Hadjantonakis](#) 2014