

# A coecum szerepe a bélidegrendszer fejlődésében

Diplomamunka  
Biológus mesterszak  
Molekuláris Genetika, Sejt- és Fejlődésbiológia specializáció

Készítette:  
**KOVÁCS TAMÁS**

Témavezető:  
Dr. habil. Nagy Nándor  
egyetemi docens  
Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Belső konzulens:  
Dr. Molnár Kinga  
egyetemi adjunktus  
Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
BIOLÓGIAI INTÉZET



Budapest, 2019.

## **Tartalomjegyzék**

Bevezetés.....	3
Irodalmi áttekintés.....	4
A bélidegrendszer általános felépítése.....	4
A bélidegrendszer embrionális fejlődése és a ganglionléc sejtek.....	6
A bélidegrendszert érintő neurocristopathiák; Hirschsprung-kór.....	9
Hirschsprung-kór hátterében álló molekuláris mechanizmusok.....	10
A BMP jelátvitel és szerepe a bélidegrendszer fejlődésében.....	11
Célkitűzések.....	12
Anyagok és módszerek.....	13
Kísérleti állatok.....	13
A minták szövettani feldolgozása.....	13
Zselatinos-szacharózos fagyasztott metszetek készítése.....	13
Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia.....	15
Immunhisztokémia.....	15
Immunfluoreszcencia.....	16
„Whole mount” immunfestés.....	16
Felhasznált oldatok, előhívószerke.....	19
Sejtosztódás kimutatása EdU jelöléssel.....	20
Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás.....	20
Függesztett szervtenyészetek, ablációs kísérletek.....	21
In situ hibridizáció.....	21
Eredmények és megvitatásuk.....	25
A sejtosztódás meghatározása a fejlődő bélidegrendszerben.....	25
A coecum eltávolításának hatása a fejlődő bélidegrendszerre.....	27
A BMP4 expressziója a coecum telepében.....	29
A BMP jelátvitel gátlása és szerepe a bélidegrendszer fejlődésében.....	30
Következtetések.....	31
Összefoglalás.....	32
Summary.....	33
Hivatkozások.....	34

## ***Rövidítésjegyzék***

ABC	avidin-biotin-peroxidáz komplex
Bfabp	korai glia marker (Brain fatty acid binding protein)
BMP	csont morfogenetikus fehérje (bone morphogenetic protein)
BrdU	bromodeoxyuridine
BSA	szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)
CSPG	kondroitin-szulfát proteoglikán (chondroitin sulfate proteoglycan)
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindole-dihidrochloride
DEPC	Diethyl-pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRG	dorzális gyökérdúc (dorsal root ganglia)
E	embrionális nap (embryonic day)
ECM	extracelluláris mátrix (extracellular matrix)
EdnRB	B-típusú endothelin receptor (Endothelin Receptor type B)
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
ENCC	entericus ganglionléc-eredetű sejt (enteric neural crest-derived cell)
ENS	bélidegrendszer (enteric nervous system)
ET-3	endothelin-3
GDNF	glia-eredetű növekedési faktor (glial cell-derived neurotrophic factor)
GFAP	glia marker (Glial fibrillar acidic protein)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
HAND2	Heart-and neural crest derivatives-expressed protein 2
HD	Hirschsprung-kór (Hirschsprung's disease)
HH	Hamburger-Hamilton stádium
NCAM	neurális sejtadhéziós molekula (neural cell adhesion molecule)
NCC	ganglionléc-eredetű sejt (neural crest-derived cell)

NCSC	ganglionléc-össejt (neural crest stem cell)
NoR	Remak-ganglion (Nerve of Remak)
nNOS	neurális nitrogén-monoxid szintáz (neuronal nitric-oxid synthase)
NT-3	neurotrophin-3
PBS	foszfát pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PenStrep	penicillin-streptomycin
Phox2b	paired-like homebox 2b
RCAS	Replication-Competent ASLV Long Terminal Repeat with a Splice acceptor
Ret	tirozin-kináz receptor (Receptor tyrosine kinase)
Sox10	SRY-related HMG-box 10
VIP	(vazoaktív intesztinális fehérje) vasoactive intestinal peptide

## ***Bevezetés***

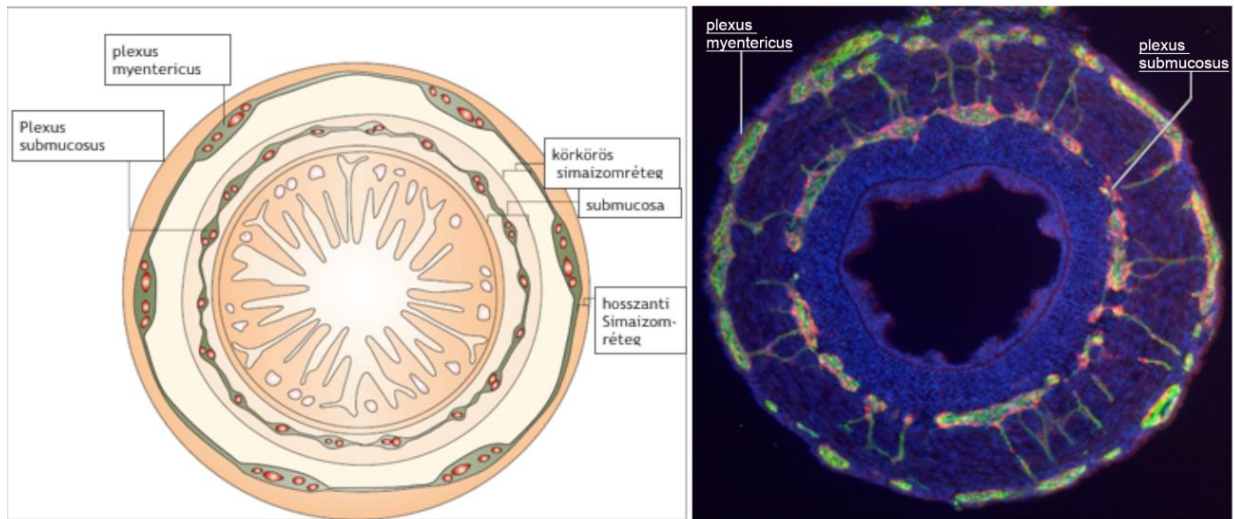
A gasztrointesztinális traktus számos funkciójának koordinálásáért a neuronok és gliasejtek hálózatából álló bélidegrendszer (ENS, enteric nervous system) a felelős. Ezek a sejtek a velőcsőből származnak és a bél irányába vándorolnak, majd azt elérve folytatják útjukat, hogy a béltraktus teljes hosszát kolonizálják. A folyamatot szabályozó molekuláris és sejt-eseményekkel kapcsolatban az elmúlt évtizedek során számos új ismeretet szereztünk. A bonyolult szignalizációs útvonalak megértéséhez nagymértékben hozzájárult a rágcsáló, madár és zebradánió modellállatok alkalmazása. Ezek a tanulmányok hangsúlyozzák a bélidegrendszer fejlődésének dinamikus természetét, illetve kiemelik, hogy mennyire fontos a megfelelő egyensúly az enterális ganglionléc eredetű sejtek vándorlása, proliferációja és differenciálódása között. Különösen a proliferáció bír kiemelkedő jelentőséggel, ugyanis ez befolyásolja a sejtsűrűséget és a vándorlás sebességét, melyek a bél teljes kolonizációjáért felelősek. A fenti folyamatokban bekövetkező hibák különböző neurointesztinális betegségekhez vezethetnek, melyek kezelése ma is nagy kihívást jelent a klinikum számára. Az utóbbi időben a bélidegrendszer fejlődésével és működésével kapcsolatban összegyűlt rengeteg adat ellenére ma is kevés információval rendelkezünk a kórképek hátteréről és kialakulásuk mechanizmusáról. A legismertebb veleszületett neurointesztinális elváltozás a Hirschsprung-kór. A rendellenesen fejlődő bélidegrendszer gyógyítása jelenleg csak sebészi úton lehetséges. A napjainkban zajló intenzív őssejtkutatásoknak köszönhetően a Hirschsprung-kór kezelési alternatívájaként egyre gyakrabban kerülnek szóba regeneratív medicinai megoldások, így a sejttranszplantáció lehetősége. A kezelési protokollok bővítéséhez, a jövőbeni őssejttranszplantáció megvalósításához elengedhetetlen az enterális idegrendszert érintő veleszületett megbetegedések molekuláris hátterének megismerése és kialakulásuk fejlődésbiológiai hátterének megértése.

## ***Irodalmi áttekintés***

### **A bélidegrendszer általános felépítése**

A bélidegrendszer (enteric nervous system, ENS) a perifériás idegrendszer legnagyobb önálló egysége, a tápcsatorna teljes hosszában megtalálható neuronok és gliasejtek komplex hálózata, mely a gasztrointesztinális traktus számos funkcióját szabályozza, beleértve a bél motilitását is. A bélidegrendszer strukturális és funkcionális szempontból egyaránt szoros kapcsolatban áll a központi idegrendszerrel és az autonóm ganglionokkal. A két rendszer közti szoros kapcsolatot alátámasztja többek között az is, hogy a bélidegrendszerben is azonosították a központi idegrendszerben megtalálható klasszikus ingerületátvivő anyagokat (Furness és Costa, 1980). Ezek ellenére is a bélidegrendszer nagymértékben független a központi idegrendszertől, emellett pedig a szervezet második legnagyobb neurális hálózatát alkotja a hozzávetőlegesen 100 millió, 18 különböző osztályba sorolható neuronjával (Brookes, 2001; Schemann, 2005). A bolygóideg (n. vagus) preganglionáris rostjai csak a duodenum magasságáig futnak, ebből kifolyólag az ettől caudalisabban elhelyezkedő bélszakaszt az automáciájának és morfológiai sajátosságainak köszönhetően „második agynak” is hívott bélidegrendszernek kell szabályoznia (Goldstein és mtsai., 2013). A bélidegrendszert alkotó neuronok négy fő osztályba sorolhatók: intesztinofugális neuronok, intrinsic primer afferens neuronok, interneuronok és motoneuronok. Az entericus ganglionokban található ganglionléc eredetű neuron- és glia sejteken kívül nemrég kerültek leírásra az intraganglionáris makrofágok, melyekről feltételezzük, hogy a központi idegrendszeri mikrogliahoz hasonló sejtek a bélidegrendszerben (Dora és mtsai., 2018).

Az entericus neuronokból és glia sejtekből álló ganglionok interganglionáris rostokon keresztül összekapcsolódnak és a bélfal mentén két koncentrikus gyűrűbe rendeződnek. Az idegi plexusok a körkörös simaizomréteg két oldalán helyezkednek el: a körkörös és hosszanti simaizomréteg között található a myentericus vagy Auerbach-féle plexus, ami a gasztrointesztinális traktus teljes hosszában megtalálható. A belső, lumen felé eső oldalon található a submucosus plexus vagy Meissner-féle plexus, mely a nyelőcső területén hiányzik (Timmermans és mtsai., 2001) (1. ábra).



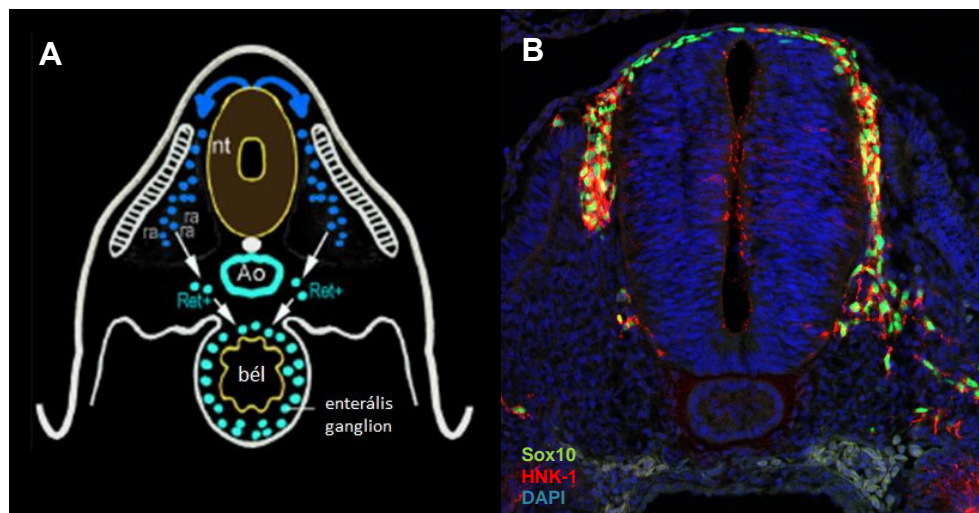
**1. ábra: A bélidegrendszer az emlős és a madár vastagbélben.** (A) Az entericus neuronok két plexus mentén ganglionokba rendeződnek (zöld). A külső myentericus plexus a hosszanti és a körkörös simaizomréteg között található, míg a belső submucosalis plexus a körkörös simaizomréteg lumenális oldalán található. (Haneu és Pachnis 2007). (B) 12 napos embrión végzett hármas fluoreszcens jelölés a glia (Brain-fatty acid binding proteint expresszál, zöld szín) és a neuron (béta-III-tubulint expresszál, piros szín) sejtekből álló plexusok (myentericus és submucosalis) ganglionjait jelöli. (Nagy és mtsai., 2012)

Az érző, motoros és interneuronok alkotta lokális reflexívek felelősek a bonyolult autonóm funkciók ellátásáért, szabályozzák a mirigyek működését, a bél motilitását, víz- és ionszekrécióját, illetve a gasztrointesztinális rendszer vérellátását, immunhomeosztázisát (Kirchgessner és Gershon, 1990). A bélidegrendszert érintő elváltozások súlyos egészségügyi következményekkel járhatnak. A kórképek gyógyításához, a jövőbeni terápiás eljárások kidolgozásához elengedhetetlen a struktúra és funkció feltárása mellett az embrionális fejlődés szélesebb körű ismerete.

## A bélidegrendszer embrionális fejlődése és a ganglionléc sejtek

Minden gerinces egyedfejlődésének korai szakaszában megjelenik egy átmeneti, a ganglionlécet (neural crest, crista neuralis – NC) alkotó multipotens őssejtpopuláció, melynek tagjai csak a metasztatikus tumorsejtekhez hasonlítható migrációs és inváziós képességgel bírnak. A vándorló dúclécseltek az embrió szinte minden szervébe eljutnak, ahol elsősorban a szöveti mikro környezet hatására ideg- és gliasejtekké, csont-, porc- és kötőszöveti elemekké, endokrin sejtekké vagy melanocytákká differenciálódnak (Bronner és LeDouarin, 2012; Hutson és Kirby, 2007; N M Le Douarin és Teillet, 1973; Nicole M Le Douarin, 2004; Yntema és Hammond, 1954).

A ganglionléc a gerincesek embriogenezise során az ectodermában, a velőlemez (lamina neuralis) és a nem-neurális (epidermális) ectoderma határán alakul ki. A neuruláció folyamán a velőredők és a velőbarázda létrejöttével ez a határterület felemelkedik, majd a velőcső záródásával és besüllyedésével a ganglionléc a velőcső dorsalis felszínére kerül. A ganglionléc-re jellemző géneket (Foxd3 és Sox10) kifejező sejtek leválnak a velőcsőről (delamináció) és ezzel egy időben végbemenő epitheliális-mesenchymalis tranzíció (EMT) után a ganglionléc-őssejtek (neural crest stem cells – NCSC; Stemple és Anderson, 1992) az embrió különböző részeibe vándorolnak (2. ábra).



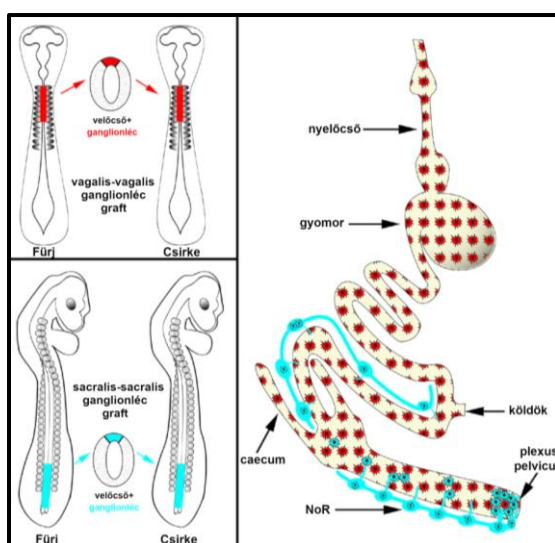
**2. ábra: A bélidegrendszer velőcső eredetű sejtekből származik.**

- (A) Sémás rajz a velőcső nyaki szakaszából kivándorló ganglionléc sejtekről. A velőcső és a szomiták közt ventrálisan haladó sejtek retinsav hatására c-ret receptort expresszálnak, kolonizálják a belet és belőlük fejlődik ki a bélidegrendszer. (Nagy és Goldstein, 2017. nyomán módosítva)
- (B) 17 HH csirke embrió keresztmetszetén megfigyelhetőek a bélcső felé vándorló sejtek. (saját felvétel)



A cranialis tájékra jellemző ganglionléc az elő-, közép- és utóagy magasságában húzódó szakaszát alkotó őssejtekből jön létre és a craniofacialis támasztó szövetet, az arctájéki lágy szöveteit, valamint egyes agyidegek gliasejtjeit és érződucait hozza létre. A következő, nyaki régiót alkotó ganglionléc sejtek szívből az aorticopulmonalis septumot, a szívből kilépő nagyerek falának simaizom elemeit és az enterális dúcokat alakítják ki. A törzsi régióból kivándorló sejtek hozzák létre a dorsalis gyökérdúcok (dorsal root ganglia – DRG) láncolatát, a perifériás idegrendszer szimpatikus ducait, a Schwann-sejteket és a mellékvesevelő kromaffin sejtjeit. A sacralis tájék a disztális colorectum és a kismedencei zsigerek vegetatív beidegzését hozza létre. Melanocyta irányba viszont a ganglionléc minden őssejtje képes differenciálódni (Kuo és Erickson, 2010).

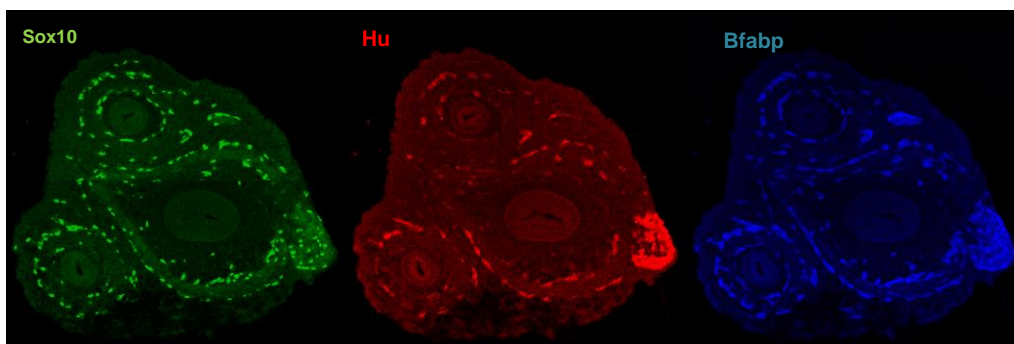
A ganglionléc-eredetű sejteket elsőként His írta le madár embrióban, 1868-ban (Bronner és Simões-Costa, 2016; His, 1868). Yntema és Hammond 1954-ben csirke embriókon végzett kísérletekkel igazolta először a bélidegrendszer és a ganglionléc fejlődéstani kapcsolatát. A kísérlet során mikromanipulációs módszerekkel eltávolították (abláció) a vagus tájékra eső ganglionléc területét, mely a bélidegrendszer teljes hiányához vezetett. Pár évtizeddel később a bélidegrendszer eredetének pontosabb meghatározásához csirke-fürj velőcső kimérák létrehozásával nyílt lehetőség. Ezzel a módszerrel pontosan igazolni lehetett, hogy a bélidegrendszert létrehozó őssejtek a vagalis tájékról (1-7 őscsigolya szintje) és a sacralis régiókból (28-as őscsigolyától caudalisan) származnak (Burns és mtsai., 2002; Nagy és mtsai., 2007) (3. ábra). A neurulációt követően a ganglionlécéből származó őssejtek a velőcső dorsalis területéről kilépve a bélcső felé vándorolnak, az előbél magasságában pedig belépnek a béltraktusba, majd annak mesenchymájában cranio-caudalis irányban vándorolnak (2. ábra).



**3. ábra: Csirke-fürj embriókkal végzett kísérletekkel igazolták először, hogy csaknem a teljes bélidegrendszert a velőcső nyaki szakaszából kivándorló ganglionléc sejtek hozzák létre.**

A vagus tájékról (vagal neural crest) kivándorló sejteket piros, a velőcső caudalis szakaszából (sacral-neural crest) származókat pedig kék szín jelzi. (Goldstein és Nagy, 2008)

A bélfalban rostrocaudalis irányba haladó ganglionléc sejtek a vándorlás során intenzíven osztódnak és differenciálódnak. A csirke embrióban a vastagbél szakaszát az embrionális fejlődés 6. és 8. napja között kolonizálják. A béltraktus kolonizációja során az elől haladó, ún. vezető sejtek („wavefront” cells) intenzíven osztódnak és fokozatosan belépnek a bél ganglionlécsejt-mentes területeire, míg a mögöttük hozzávetőlegesen 400 µm-ra lévő sejtek glia és neuron irányba differenciálódnak. A neuron irányban elkötelezett sejtek kezdetben pán neuron markereket fejeznek ki, ilyen például a béta-III-tubulin típusú mikrotubulus fehérje, és a neuronokra specifikus RNS-kötő molekula, a HuC/D fehérje. A glia irányba differenciálódó sejtek kezdetben Bfap-t (Brain fatty acid binding protein) expresszálnak, később pedig GFAP-t (Glial fibrillary acidic protein) (4. ábra).



**4. ábra: A ganglionléc (Sox10), neuron (Hu) és glia típusú (Bfap) molekulák expressziója 6 napos csirke embrió fejlődő bélidegrendszerében a coecum szintjében (saját felvételek)**

Valamennyi gerincesre jellemző, hogy a bélidegrendszert létrehozó ganglionlécsejtek Sox10 és Phox2b transzkripciós faktort expresszálnak, felszínükön p75 típusú neurotrophin receptort, N-cadherin sejtadhéziós molekulákat, valamint olyan receptorokat (endothelin receptor B és a tirozin-kináz típusú c-ret fehérjék) fejeznek ki, amelyek az embrionális bélcső mesenchymájában termelt, endothelin-3 és glia eredetű neurotrophicus faktor típusú növekedési faktorokat kötik meg. Mindkét növekedési faktorra jellemző, hogy a disztális bélszakasz területén első expressziós helyük a közép- és utóbél határán található coecum mesenchymájában figyelhető meg. A GDNF (glia eredetű növekedési faktor) kemoattraktáns hatására a középbélben vándorló ganglionléc sejtek folytatják migrációs irányukat és töretlen lendülettel benépesítik az utóbelet is. Az endothelin-3 (ET-3) expressziója először szintén a coecumban figyelhető meg. Ennek hatását a GDNF befolyásolja: csökkenti a GDNF-indukált korai differenciálódást és fenntartja az intenzív sejtosztódást. A mesenchymalis eredetű faktorok jelátviteli folyamataiban bekövetkező változás rendellenes bélidegrendszer kialakulását eredményezi. A GDNF vagy ET-3 hiánya veleszületett aganglionózist okoz, ami az esetek 80%-ában a coecum mögötti területeken jelentkezik és a teljes disztális colorectumot érinti. A GDNF és ET-3 korai, coecum specifikus expressziója felveti annak a lehetőségét, hogy más morfogénekkal kölcsönhatva organizátor centrumként működik.

## **A bélidegrendszert érintő neurocristopathiák; Hirschsprung-kór**

A ganglionléc-eredetű sejtek fejlődésében bekövetkezett hibákat veleszületett neurocristopathiáknak nevezzük (Bolande, 1997; Etchevers és mtsai., 2006). Ezek két fő csoportba sorolhatók: az egyikbe a proliferációs zavarok és tumorok sorolhatók (pl. neurofibromatosis, neuroblastoma), a másik csoportba az olyan megbetegedések tartoznak, amelyek kialakulásáért a ganglionléc-sejtek rendellenes osztódása, vándorlása vagy differenciációja tehető felelőssé. Ilyenek az aorticopulmonalis septum defektus, a DiGeorge szindróma, vagy a bélidegrendszert érintő zavarok is. A human bélidegrendszer fejlődési rendellenességeit a neuronok számbeli elváltozásai alapján osztályozhatjuk, így beszélhetünk hiperganglionózisról (ganglioneuroma), hipoganglionózisról (intesztinális pszeudo-obstrukció) és teljesen neuron mentes (aganglionotikus) bélszakasról (Hirschsprung-kór) (Kapur, 2000). Ez utóbbi a bélidegrendszert érintő fejlődési rendellenességek közül az egyik legjobban vizsgált és egyben leggyakoribb, amit első leírójáról, Harald Hirschsprung dán gyermekgyógyásról neveztek el.

Ez a veleszületett, elsősorban a vastagbél idegrendszerét érintő elváltozás emberben 1:5000 arányban fordul elő. A nemek közti arány négyszeres férfi túlsúlyt mutat. Előfordulhat egyéb születési rendellenesség részeként is, így pl. Shah-Wardenburg szindróma és Mowat-Wilson szindróma esetében. A Hirschsprung-kór rendszerint egyéb bélidegrendszeri hibákkal társul, mint a neuronok hiperpláziája, ektopikus ganglionok, hipoganglionózis, neuron degeneráció. A betegség fő tünetei a bélmotilitás zavara, a tágult has, epés hányás, székrekedés (Heanue és Pachnis, 2007). Jelenleg sajnos a Hirschsprung-kór súlyosabb eseteinél az egyetlen kezelési mód az aganglionotikus bélszakasz sebészi eltávolítása.

Az utóbbi időben számos kutatócsoport hívta fel a figyelmet az összejtterápiában rejlő lehetőségekre. Ennek hatására a bélidegrendszer fejlődésének vizsgálata különböző modellrendszerekben is megindult. A bélidegrendszert érintő betegségek patogenezisének vizsgálatához olyan modellrendszerre van szükségünk, mely fenotípusa a humán normál vagy patológiás állapotokban leírtakhoz nagyon nagy mértékben hasonlít. A különböző állatcsoportokban a bélidegrendszer kialakulásának mechanizmusa eltér egymástól. Kétéltűekben és hüllőkben a submucosalis plexus kizárólag a nyelőcső és a gyomor területén található, zebrahalban teljesen hiányzik, egérben pedig csak posztnatálisan jelenik meg (Gunn, 1951; Lamanna és mtsai., 1999; Wallace és Burns, 2005). Madárban és emberben egységesen, már embrionális korban mindkét plexus megjelenik. Tehát morfológiai és fejlődésbiológiai szempontból is a madár látszik a legideálisabb modellnek a bélidegrendszeri betegségek tanulmányozására.

## Hirschsprung-kór háttérben álló molekuláris mechanizmusok

A teljes bélszakasz mentén jól funkcionáló bélidegrendszer kialakítása érdekében a ganglionléc sejtekenek komplex fejlődési folyamaton kell átesniük: ezek közé tartozik a migráció, túlélés, osztódás, neuron és glia irányú differenciálódás és ganglion képződés. A veleszületett bélidegrendszeri hibák háttérben legtöbbször a ganglionléc-eredetű sejtre specifikus transzkripciós faktorok, adhéziós molekulák vagy az embrionális bél szöveteiben termelődő növekedési faktorok, morfogének génmutációja állhat.

A bélidegrendszer fiziológiás (és patológiás) fejlődését számos transzkripciós faktor (Sox10, Phox2b, Hand2, Mash1) szabályozza. A Sox10 (SRV-related HMG-box 10) transzkripciós faktor esszenciális a bélidegrendszer fejlődéséhez, szükséges a Ret, EdnrB és Phox2b (paired-like homeobox 2b) molekulák ganglionléc-eredetű sejteken való zavartalan expressziójához, így részt vesz a sejtek multipotenciájának fenntartásában (Lang és mtsai., 2000; Zhu és mtsai., 2004). Homozigóta nullmutációja teljes aganglionózishoz vezet, míg a heterozigóta mutánsban disztális aganglionózis alakul ki (Kapur, 1999; Southard-Smith és mtsai., 1998). A Phox2b transzkripciós faktor mutációja esetén a Sox10 szupressziója nem következik be, ezáltal az entericus ganglionléc-eredetű sejtek differenciálódása a glia sejtvonal irányába tolódik el; ez pedig a vastagbél disztális szakaszának aganglionózisához valamint hipoganglionózishoz és ektopikus ganglionok megjelenéséhez vezet (Nagashimada és mtsai., 2012). A Mash1 transzkripciós faktor delécioja késleltetett neurogenézisben és a nyelvcső területén, az entericus neuronok hiányában nyilvánul meg (Guillemot és mtsai., 1993; Memic és mtsai., 2016). A HAND2 (Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 2) egyike a neurotransmitter specifikációhoz szükséges transzkripciós faktoroknak. Mutációja esetén a bélidegrendszer kolonizációja ugyan végbemegy, de a neuronális differenciáció károsodása, az entericus neuronok számának csökkenése és az nNOS-, calretinin-, és VIP termelő neuronok elvesztése következtében funkcionális aganglionózis alakul ki (D'Autreaux és mtsai., 2011; Lei és Howard, 2011).

A mesenchymalis faktorok közül a legfontosabb a neurotrofikus faktorok családjába tartozó, glia eredetű növekedési faktor (GDNF). és a ganglionléc-eredetű sejtek felszínén megtalálható receptor (Ret) funkciója. A kemoattraktáns hatású GDNF kezdetben a gyomor, a coecum és a kloáka területén koncentrálódik, mely felveti azt az elképzelést, hogy a bélmesenchyma kolonizációja koncentráció gradiens mentén megy végbe (M Fu és mtsai., 2004; Nagy és Goldstein, 2006a). A GDNF mediálta szignálút vonal szerepe egyaránt elengedhetetlen a ganglionléc-eredetű sejtek túlélésében, proliferációjában, migrációjában és differenciációjában. Nem meglepő módon így a Ret mutáció a betegség egyik fő rizikófaktora,

mégis ez önmagában nem mindig okoz aganglionosist (Goldstein és mtsai., 2013). A szintén mesenchymalis eredetű ET-3 növekedési faktor a ganglionléc-eredetű sejteken található receptor komplexén (endothelin receptor-B, EdnrB) keresztül fokozza a ganglionléc-eredetű sejtek osztódását, lassítja a differenciálódást, így fenntartja a sejteket egy elkötelezetlen, proliferatívabb stádiumban (Goldstein és mtsai., 2008; Nagy és Goldstein, 2006b). Érdekes módon a coecum eléréséig az entericus ganglionléc-eredetű sejteknek nincs feltétlenül szükségük az EdnrB jelátvitelre (Druckenbrod és Epstein, 2005). Ez megmagyarázza, hogy az EdnrB-ET3 jelátvitel hibája miatt a coecum alatt, a colorectalis területen okoz aganglionóziót.

### **A BMP jelátvitel és szerepe a bélidegrendszer fejlődésében**

Korábbi *in vivo* és *in ovo* vizsgálatok szerint a bél mesenchymájában termelődő *BMP* (bone morphogenetic protein) típusú növekedési faktorok is részt vesznek a bélidegrendszer fejlődésében (Chalazonitis és Kessler, 2012; De Santa Barbara és mtsai., 2005; Goldstein és mtsai., 2005). Először PCR vizsgálatokkal igazolták, hogy a *BMP2*, *BMP4*, illetve receptor alegységeik, így a *BMPR-IA*, *BMPR-IB* és *BMPR-II* és a BMP antagonisták, pl. noggin, gremlin, chordin és follistatin egyaránt kifejeződnek a bélidegrendszer prekursor sejtjein (ENCC) és nem ganglionléc-eredetű sejteken az embrionális fejlődés azon stádiumában, amikor az első differenciálódott neuronok is megjelennek (Chalazonitis és mtsai., 2004). Aktivitásuk szabályozza az ENCC migrációját (Fu és mtsai., 2006; Goldstein és mtsai., 2005) és az enterikus neuronok (Chalazonitis és mtsai., 2008) és a gliasejtek (Chalazonitis és mtsai., 2011) differenciációját. A *BMP*-k fontos szerepet játszanak a bélben található neuronok és glia sejtek arányának meghatározásában. Ezt támasztja alá a BMP jelátvitel noggin-nal történő gátlása, ahol a teljes neuron szám nőtt (Chalazonitis és mtsai., 2008), a glia sejtek denzitása viszont csökkent (Chalazonitis és mtsai., 2011). A *BMP*-k támogatják a ganglionogenezist is, melynek során a gangliont alkotó sejtek NCAM-ot (neural cell adhesion molecule) expresszálva aggregálódnak. A *BMP* faktorok a neuron altípusok diverzitását is befolyásolják az által, hogy specifikusan támogatják a TrkC-t expresszáló enterikus neuronok fejlődését (Chalazonitis és mtsai., 2004). A TrkC egy, a bélidegrendszer sejtjeinek altípusa által expresszált tirozin kináz receptor, amihez a neurotrophin-3 (NT-3) kötődik és jelenléte a neuronok túlélését és differenciálódását támogatja. Bármelyikük deléciója a bélidegrendszerben található enterikus neuronok számának csökkenéséhez vezet (Chalazonitis és mtsai., 2001). A *BMP4* a fejlődő coecumban jelen van, szükséges annak kialakulásához is (Zhang és mtsai., 2006).

## ***Célkitűzések***

Az elmúlt évtizedek során a madár embrió, mint fejlődésbiológiai modell, újra az érdeklődés középpontjába került. Laboratóriumunkban már két évtizede mi is rutinszerűen használjuk fejlődésbiológiai, kísérleti embriológiai kérdések megválaszolására.

Munkám célkitűzései a következők voltak:

- Csirke embrió modellben karakterizálni a bélidegrendszer fejlődését a ganglionléc őssejtek közép- és utóbél szakaszon való áthaladása során (proliferációs vizsgálatok).
- Meghatározni a coecum szerepét a vastagbél idegrendszerének fejlődésében (abláció, szervtenyésztés módszerével).
- Korábbi munkákból felmerül, hogy a *BMP* mesenchymalis növekedési factor a coecumban fejeződik ki először, ezért a jelátvitel coecumban betöltött esszenciális szerepét igazolása (in situ hibridizáció, szervtenyésztés BMP inhibitor jelenlétében).

## ***Anyagok és módszerek***

### **Kísérleti állatok**

Kísérleteimhez és immuncitokémiai vizsgálataimhoz csirke (*Gallus gallus*, White Leghorn SPF, Phylaxia-Sanophi, Magyarország) coecumot tartalmazó vékony- és vastagbél szakaszokat használtam. A madártojásokat laboratóriumunk keltetőgépeiben (38°C hőmérsékleten, 70%-os páratartalom mellett) forgatórácon inkubáltam. A pontos fejlődési kor meghatározására a Hamburger-Hamilton (HH) stádiumokat (Hamburger V. és Hamilton HL., 1951) használtam. Az öt napos és annál idősebb embriók esetén napokban fejezem ki az embrionális kort (E). A kísérleti célokra felhasznált állatok tartása és feldolgozása megfelelt az állatvédelmi törvényekben előírtaknak és a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának (MÁB) jóváhagyásával történt.

### **A minták szövettani feldolgozása**

#### Zselatinos-szacharózos fagyasztott metszetek készítése

Az immuncitokémiai, és immunfluoreszcens vizsgálatokhoz zselatinos fagyasztott blokkot készítettem. Az embrionális szerveket sztereomikroszkóp alatt (5. ábra), mikropreparációra alkalmas eszközökkel (mikroolló, csipeszek, rovartűk, embrióspatula) távolítottam el.



**5. ábra: Az embrionális szervek izolálása során használt kísérleti beállítás.  
(Nikon SMZ25 fluoreszcens sztereomikroszkóp)**

A zselatinos blokkok készítéséhez laboratóriumunkban beállított módszert használtam (Nagy és mtsai., 2001). A kipeparált szerveket 1 órán keresztül fixáltam pufferelt 4 %-os paraformaldehidben, majd foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) háromszor 5 percig mostam. Következő lépésben 15 %-os szacharóz (Reanal puriss, 07140-0-08-38) 0,1 M-os foszfát-puffer oldatában (PBS, pH=7,2) 1 éjszakán át inkubáltam a mintákat, 4 °C-os hűtőszekrényben. Ezután a cukros oldatot zselatinosra cseréltem, ami PBS-ben oldott szacharózt (15 %) és zselatint (7,5 %, Sigma, G2500) tartalmazott (inkubálási idő: 1 óra, 37 °C-on). Az impregnált szerveket zselatin ággal előkészített tálkákba raktam. Hagytam 10 percig állni, hogy a szervek a zselatinhoz tapadjanak, majd meleg zselatinnal befedtem őket. A második réteggel történő lefedés előtt felmértem, hogy nincs-e túl nagy hőmérsékletkülönbség a két zselatinréteg között, ami a későbbiekben a fagyasztás folyamán a blokk szétrepedéséhez vezethet. 4 °C-on szilárdulni hagytam, majd körbevágással kialakítottam a kívánt méretű blokkot. Az így nyert zselatin blokkokat Tissue-Tek mátrix segítségével (Sakura Europe, 4583) kartonpapírra rögzítettem, majd folyékony nitrogénben lehűtött, -50 °C-os izopentánban (2-metilbután, Sigma M32631) lefagyasztottam. A metszést Shandon gyártmányú kriotómmal -24 °C-on végeztem, melyet megelőzően a blokkokat a kriosztátba helyeztem, annak érdekében, hogy átvegyék a -24 °C-os munkahőmérsékletet. A 12 µm vastag metszeteket poly-L Lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezekre vettem fel, majd felhasználásukig -20 °C-on tároltam.



## **Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia**

### Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat fagyasztott metszeteken végeztem. Első lépés a rehidrálás: a zselatinos metszeteket először a zselatin kioldódása érdekében előre felmelegített PBS-be helyeztem (10 perc). Ezt követően rámértem a metszetekre a primer ellenanyagot [I. táblázat] (50-80 µl/metszet). Az ellenanyagot 1%-os BSA-t (BovineAlbumin, Sigma A9647) és Na-azidot tartalmazó PBS-ben hígítottuk ki. A primer ellenanyaggal lefedett metszeteket 45 percig, szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltam. Ezt PBS-es mosás követte (3x5 perc). Szekunder ellenanyagként leggyakrabban biotinnal konjugált, lóban termeltetett anti-egér IgG-t használtam (Vector Laboratories, BA-2000; PBS-BSA-ban feloldva 1:200-as hígításban, lásd II. táblázat), amellyel további 45 percig inkubáltam a mintákat szobahőmérsékleten és nedves kamrában. Újabb PBS-ben végzett mosást követően, a szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolására a metszeteket PBS-el 3%-ra hígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ba (Sigma Aldrich, H1009) helyeztem 10 percre, majd ezt szintén mosás követte PBS-ben (3x5 perc). A mosás után ABC komplexet (avidin-biotin-peroxidáz komplex, Vectastatin Elite PK-6100, Vector Laboratories) vittem fel a metszetekre, amiket fél órán keresztül inkubáltam. Az ABC oldatot a cég által megadott hígításban készítettem el (1:100 arányban. PBS-ben), PBS-be kimértem az avidint, majd a biotínált peroxidázt tartalmazó oldat megfelelő mennyiségét, alaposan felkevertem, majd fél óra állás után használtam fel. Az ellenanyag-ABC komplexhez kötődött peroxidáz enzim aktivitását 4-chloro-1-naftol (Sigma, C8890) oldatában hívtam elő, ami kékesszürke színreakciót eredményezett. Az oldat készítése a következőképpen történt: a kloronaftolt előzetesen kimértem és PBS-be vittem (100 µl 4-chloro-1-naftol törzsoldat 100 ml PBS-ben oldva), majd az oldatot sötétben, mágneses keverőn legalább fél órát kevertettem. Felhasználás előtt átszűrtem szűrőpapíron, majd 300 µl 3 %-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot adtam hozzá. A metszeteket ebben az oldatban 30 percig sötétben inkubáltam. PBS-es mosás után (3x5 perc) a metszeteket vízdoldékony fedőanyaggal (Poly-Aqua Polyscience Inc., Warrington PA, USA; 18606) fedtem le és ezután 4 °C-on hűtőben tároltam.

## Immunfluoreszcencia

### *Kettős immunfluoreszcens festés*

A kettős immunfestés első lépésében a metszetekre rámértem az első primer ellenanyagot, melyet 1 órán át inkubáltam. A mosást (PBS) követően közvetlenül fluorokrómmal jelölt szekunder ellenanyagot vittem fel a metszetekre, mely a primer ellenanyagnak megfelelő izotípus specifikus volt. A munkafolyamat további lépéseit a fluorokróm fényérzékenysége miatt fénytől védett helyen végeztem. 45 perces, nedves kamrában történő inkubálás után PBS-es mosást alkalmaztam (3x5 perc). Ezután a metszetekre rámértem a második primer ellenanyagot, szintén 1 óra hosszát inkubáltam, majd mostam PBS-ben (3x5 perc). A második szekunder ellenanyagot (mely a második primer ellenanyaghoz fajspecifikus volt) úgy választottam meg, hogy a vele konjugált fluorokróm színe eltérjen az előzőleg használt szekunder ellenanyag színétől. A metszetekre való pipettázást 45 perces inkubáció követte. Az inkubálások között, illetve után PBS-el mostam a metszeteket (3x5 perc). A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride, Invitrogen, D1306) reagenst használtam, PBS-ben hígítva 1 µg/ml arányban. Ezt 10 percig hagytam a metszeteken, majd mosás következett PBS-ben (3x5 perc). Ezt követően a metszeteket lefedtem és sötétben, 4 °C-on tároltam őket.

### „Whole mount” immunfestés

A “whole mount” vagy teljes szervi immunfestésekhez 5 és 6 napos embriók disztális bélszakaszát használtam fel, melyeken érintetlenül hagytam a coecum-ot vagy mikrosebészeti módszerek segítségével eltávolítottam azt. A normál és coecum ablált beleket 4 %-os PFA-ban egy éjszakán át 4 °C-on, hűtőben fixáltam. Ezután 12 lyukú plate lyukaiba osztottam a mintákat és 0,1 %-os Triton-X-es PBS-ben egy éjszakán át 4 °C-on antigen feltárást végeztem. A primer antitestet (β3-tubulin [Tuj1] AA10 klón, Santa Cruz, sc-80016) 1:400-ban hígítottam PBS-BSA-ban, 1 % kecske szérum mellett, ezzel 1-1,5 órán keresztül inkubáltam a mintáimat szobahőn, rázatás mellett. Ezután egy éjszakán át PBS-es mosás következett. 4 °C-on, rázatva. Másnap a szekunder ellenanyagot (kecske anti-egér IgG(H+L) Alexa-488 (A11001) 1 órán át, szobahőn, rázatás mellett, fénytől védve inkubáltam. Egy órás szobahőmérsékleten történő PBS-es mosást követően a fotókat Nikon SMZ25 fluoreszcens sztereomikroszkóppal és a NIS-Elements szoftver segítségével készítettem el.

I. táblázat. Az immunfestések során felhasznált primer antitestek listája

Ellenanyag (klón)	Forrás	Antigén specificitás	Felismert sejtípusok, struktúrák	Hígítás	Beszerzés forrása (katalógus szám)
HNK1	egér	IgM	csirke enterális ganglionléc sejtek	1:50	ThermoFisher (MA5-11605)
SOX-10	egér	IgG1	csirke enterális ganglionléc sejtek	1:100	Santa Cruz (sc-365692)
6B3-c	egér	IgG1	csirke enterális ganglionléc sejtek, N-cadherin	1:5	DSHB
p75	nyúl (poliklonális)	IgG (H+L)	csirke enterális ganglionléc sejtek (neurotrophin receptor)	1:1000	Promega (G3231)
Tuj1	egér	IgG2a	neuronok (III-as típusú $\beta$ -tubulin)	1:100	Santa Cruz (sc-80016)
16A11	egér	IgG2b	HuC/D neuron specifikus RNS-kötő fehérje	1:100	Invitrogen (A-21271)
Bfabp	nyúl (poliklonális)	IgG (H+L)	gliasejtek	1:50	Dr. Thomas Müller
B3/D6	egér	IgG2a	ECM, fibronectin	1:5	DSHB
M1-B4	egér	IgG1	ECM, tenascin	1:5	DSHB
12C5-s	egér	IgG1	ECM, versican	1:5	DSHB
9BA12	egér	IgM	ECM, kondroitin-szulfát preteoglikánok	1:5	DSHB
SMA (1A4)	egér	IgG2a	$\alpha$ -simaizom-aktin	1:400	Dako (M0851)

**II. táblázat: Az immunfestés során felhasznált szekunder ellenanyagok.**  
 Biotinilált szekunder ellenanyagok neve, beszerzési forrása és katalógus száma.  
 Hígítás: 1:200 PBS-BSA-ban.

Szekunder ellenanyag	Beszerzési forrás	Katalógusszám
lóban készült biotinilált anti-egér IgG (H+L)	Vector Laboratories	BA-2000
kecskében készült biotinilált anti-nyúl IgG (H+L)	Vector Laboratories	BA-1000
kecskében készült biotinilált anti-egér IgM ( $\mu$ lánc)	Vector Laboratories	BA-2020

**III. táblázat: Fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyagok** (Invitrogen-Life Technologies, Merck). A táblázat tartalmazza az ellenanyagok faj és izotípus specificitást, a fluoreszcencia csúcsintenzitást, beszerzési forrását és a katalógus számot.

Hígítás: 1:200 PBS-ben.

Szekunder ellenanyag	Fluorokróm excitációs hullámhossza (nm)	Beszerzési forrás	Katalógusszám
kecskében készült anti-egér IgG (H+L)	350	Invitrogen-Life Technologies	A21049
szamárban készült anti-egér IgG (H+L)	488	Invitrogen-Life Technologies	A21202
szamárban készült anti-egér IgG (H+L)	594	Invitrogen-Life Technologies	A21203
szamárban készült anti-egér IgG (H+L)	647	Invitrogen-Life Technologies	A31571
kecskében készült anti-egér IgG1	488	Invitrogen-Life Technologies	A21121
kecskében készült anti-egér IgG1	594	Invitrogen-Life Technologies	A21125

Szekunder ellenanyag	Fluorokróm excitációs hullámhossza (nm)	Beszerzési forrás	Katalógusszám
kecskében készült anti-egér IgG2a	488	Invitrogen-Life Technologies	A21131
kecskében készült anti-egér IgG2a	594	Invitrogen-Life Technologies	A21135
kecskében készült anti-egér IgG2b	594	Invitrogen-Life Technologies	A21145
szamárban készült anti-nyúl IgG (H+L)	488	Invitrogen-Life Technologies	A21206
kecskében készült anti-egér IgM	594	Invitrogen-Life Technologies	A21044

### Felhasznált oldatok, előhívószerek

1 liter PBS összetétele: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, deszt. víz  
Szacharóz-zselatin tartalmú PBS puffer: 15 mg D-szacharózt feloldottunk 100 ml PBS-ben, majd az oldatot 4 °C-on hűtőben tároltuk. A szacharózt (15 m/V%), és zselatint (7,5 m/V%) tartalmazó PBS puffert fagyasztva tároltuk -20 °C-on.

Pufferelt 4%-os paraformaldehid (PFA, pH=7,4): Egy lombikban 400 ml desztillált vizet 70C°-ra melegítettünk fel. Ezután 20 g paraformaldehidet adtunk hozzá, majd az egészet mágneses keverőre helyeztük. A keletkezett csapadékot cseppenként hozzáadott 100 µl 1-5 M-os NaOH-dal oldottuk fel. Az oldatot átszűrtük, majd 50 ml 10x-es PBS-t adtunk hozzá, majd desztillált vízzel 500 ml-re egészítettük ki. A pufferolt oldatot 15 ml-es csövekbe szétosztva -20 °C-on tároltuk.

Kloronaftol törzsoldat készítése: A törzsoldat készítéséhez 500 mg 4-chloro-1-naphtolt (Sigma, C8890) oldottunk fel 2 ml abszolút etanolban, majd -20 °C-on tároltuk. Előhíváskor a törzsoldatból készítettünk hígítást, oly módon, hogy a végkoncentráció 25 mg/100 ml PBS legyen.

#### 1%-os PBS-BSA:

1 g BSA-t (Bovine Serum Albumin; Sigma, A9647), 100 ml PBS-ben feloldottunk. Szűrés után 0,1 %-ban nátrium-azidot (NaN<sub>3</sub>) adtunk hozzá.

Diamino-benzidin (DAB) készítése: 500 µl törzsoldatot (500 mg DAB+10 ml PBS) sötétben kevertetve feloldottunk 50 ml PBS-ben. Ezt követően az oldatot leszűrtük, majd 250 µl 3%-os hidrogén-peroxidot (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) adtunk hozzá.

## **Sejtosztódás kimutatása EdU jelöléssel**

Az osztódó sejtek kimutatására 5-ethynyl-2'-deoxyuridine-t (EdU) használtunk (Click-iT EdU Imaging Kit Alexa Fluor 647, Invitrogen, C10340). A reagens egy bromodeoxyuridine (BrdU) analóg, mely az osztódó sejtek újonnan szintetizálódó DNS-ébe épül be. Ellentétben a BrdU-val, az EdU+ sejtek detektálásához nincs szükség specifikus ellenanyagra, kimutatása egy réz-ion katalizálta reakcióban történik meg. Az Alexa Fluor azid jóval kisebb mérete miatt a módszer nem igényel denaturálási lépést sem, így a sejtekkel kíméletesebb körülmények közt dolgozhatunk. Az izolált embrionális béldarabok EdU-val való jelölését a következő protokoll szerint végeztem el: az EdU-t 1:4000-es hígításban előre 38 °C-ra előmelegített sejttenyésztő folyadékban, gyors vortexelés mellett feloldottam. Az izolált szervdarabokat behelyeztem ebbe az oldatba és 38 °C-os inkubátorban, enyhe rázatás mellett 2 óráig hagytam az osztódó sejteket jelölődni. Ezután a szerveket PBS-ben mostam és 4% PFA-ban fixáltam, majd a "Minták szövettani feldolgozása" fejezetben leírt feldolgozási protokollt végeztem el rajtuk. Az immunfestések után elvégeztem az EdU előhívását. 1 ml végtérfogatú előhívó-oldathoz a következő komponensekre volt szükségem: 860 µl 1X Click iT reaction buffer, 40 µl 100 mM CuSO<sub>4</sub>, 2,5 µl Alexa Fluor azide, 100 µl 1X reaction buffer additive. Hasonlóan a primer és szekunder antitestekhez, ezekből is 70-80 µl-t mértem a lemezekre és 45 percig nedves kamrában inkubáltam, majd alaposan lemostam. A sejtmagok jelölésére DAPI-t (4,6-diaminophenylindole dihydrochloride, Invitrogen, D1306) használtam. Az adatok kiértékelése során minden esetben 5-5 embrionális bél azonos területein végeztem el a számolást. A „wavefront” azonosítására Hu/Sox10, illetve p75 kettős immunfestést végeztem el, majd a behatárolt területen az EdU+ sejteket a fent leírt módon hívtam elő. A Sox10/EdU kettősen pozitív sejtek számát hasonlítottam össze a teljes ganglionléc sejt (p75 vagy Sox10) számmal.

## **Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás**

A konfokális mikroszkópos felvételeket Zeiss LSM 710 típusú mikroszkóppal készítettük. A képek későbbi tanulmányozását, szerkesztését ImageJ és Adobe Photoshop CS 7.01 típusú szoftverekkel végeztük. A fénymikroszkópos és fluoreszcens mikroszkópos felvételeket Nikon Eclipse E800-as mikroszkóphoz csatlakoztatott Olympus DP74-es kamerával, a CellSens szoftver segítségével készítettem el.

## **Függesztett szervtenyészetek, ablációs kísérletek**

A függesztett szervtenyészetek elkészítéséhez az embrionális szerveket steril körülmények közt, penicillin-streptomycint (PenStrep, Sigma P0781) tartalmazó PBS-be gyűjtöttem. Előzetesen kis méretű üveg Petri-csészék alját nem toxikus szilikonnal öntöttük ki, majd az edényeket alkohollal, utána pedig desztillált vízzel alaposan elmostuk és sterilizáltuk. A szervdarabokat rovartűk segítségével a szilikon aljzathoz rögzítettük úgy, hogy a körülöttük lévő folyadékban lebegjenek, ne érjenek a szilikonhoz. A kontroll tenyésztést PenStrep-et tartalmazó DMEM-ben (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM 1X + GlutaMAX-I, Gibco 31966-021), 37 °C-os CO<sub>2</sub> termosztátban végeztem el, három napig. Az esetek egy részében a vékony- és vastagbél határán elhelyezkedő coecumokat mikrosebészeti módszerekkel eltávolítottuk és így végeztük el a tenyésztést. A BMP4 jelátvitel hatásának tanulmányozására 400 ng/ml és 1 µg/ml koncentrációjú rekombináns egér noggin fehérjét (Sigma SRP3227) adtunk a tenyésztő oldathoz és vizsgáltuk annak hatását. A harmadik nap elteltével a mintákat fixáltam és elvégeztem további szövettani feldolgozásukat.

## **In situ hibridizáció**

Az RNS "whole mount" in situ hibridizációs kísérletekhez 5, 6 és 7 ED csirke beleket izoláltam RNáz mentesen. A szervek izolálásához használt sterilizett eszközöket alkohollal leégettem, a munkateret előzetesen RNáz-mentesítő oldattal lefújtam (RNase ZAP, Sigma-Aldrich, kat. R2020), a tojásokat alkohollal áttöröltem. Az embriókat, majd az izolált szerveket DEPC-es PBS-be gyűjtöttem. A beleket 4%-os PFA-ban 1 órán át fixáltam, majd felszálló metanolsorban dehidráltam. A metanolt is DEPC-t tartalmazó PBS-ben hígítottam (75%; 50%; 25% PBS:MetOH). Az így előkészített anyagot felhasználásig -20 °C-on tároltam. A BMP4 in situ hibridizációs kísérlethez használt próbát Pascal de Santa Barbara laborjából kaptam. (A cBMP4 plazmidot BAMHI endonukleázzal kellett emésztetni és az antiszensz RNS próba elkészítéséhez T3 RNS polimerázt kellett használni.) A kísérletet a szakirodalomban fellelhető protokoll szerint végeztem el (Le Guen és mtsai., 2009; Moniot és mtsai., 2004).

A kísérlet elvégzése során a következő eljárást követtem:

### 1. nap

1. minták rehidrálása leszálló metanolsorban (75%; 50%; 25% PBS:MetOH; PBS), majd 2x5 percig PBT-s mosás szobahőmérsékleten
2. minták "bleach"-elése ("fehérítése") 6 % (PBT-ben hígított) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldatban 1 órán át szobahőn (1 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4 ml PBT)
3. emésztés Proteináz-K-val (Roche 03115887001) 10-15 percig szobahőn (5 µl feloldása a 10mg/ml-es törzsoldatból 5 ml PBT-ben)
4. mosás 2 mg/ml glicin oldatban 10 percig szobahőn (frissen kell elkészíteni!)
5. mosás 2x5 percig PBT-ben szobahőn
6. utófixálás 4%-os paraformaldehid és 0,2 %-os glutáraldehid oldatában 20 percig szobahőn (40 µl 25%-os glutáraldehid 5 ml 4 %-os PFA-hoz)
7. mosás 2x5 percig PBT-ben szobahőmérsékleten
8. 1 ml prehibridizációs puffer hozzáadása, majd eltávolítása, ezután 2 ml prehibridizációs pufferrel való elő-hibridizálás 70 °C-on 1 órán át, rázatva
9. prehibridizációs puffer eltávolítása, újabb 2 ml prehibridizációs puffer és a probe hozzáadása (1 µg/ml koncentrációban) és éjszakán át 70 °C-on ráztatás

### 2. nap

1. mosás 3x30 percig az I. számú oldattal 70°C-on, rázatva
2. mosás 3x30 percig az II. számú oldattal 70°C-on, rázatva
3. mosás 2xTBST-ben (2mM Levamisol / 0,1 % Tween) 5 percig, szobahőn
4. minták elő-blokkolása 10 %-os birka szérummal TBST-ben (2mM Levamisol) 2,5 órán keresztül, szobahőmérsékleten, rázatva
5. abszorpciós antitest készítése: 3 mg embrió port feloldunk 0,5 ml TBST-ben. 30 percen keresztül 70 °C-on tartjuk, majd 10 percig vortexeljük. Jégen lehűtjük, 5 µl/0,5 ml birka szérumot és 1 µl/0,5 ml anti-digoxigenin AP antitestet (Roche 11093274910) adunk hozzá. 4 °C-on 1 órán át gyengéden ráztatjuk. Ezután mikrocentrifugán 10 perc alatt 4 °C-on lepörgetjük és a felülúszót 15 ml-es csövekbe gyűjtjük. 1%-os birka szérum/TBST keverékével hígítjuk és a mintákat tartalmazó csöveket 2 ml végtérfogatra feltöltjük vele
6. eltávolítjuk a blokkoló oldatot és 2 ml abszorpciós mixet adunk hozzá, 4 °C-on éjszakán át ráztatjuk



### 3. nap

1. mosás 5x1,5 órán keresztül TBST-ben (2mM Levamisol), rázatva, 4 °C-on
2. mosás éjszaka 4 °C-on, rázatva TBST-ben (2mM Levamisol)

### 4. nap

1. mosás 2x10 percig 100mM Tris (BioRad 161-0719) (0,1 % Tween, 2 mM Levamisol-t tartalmazó, pH=8) oldatban, rázatva, szobahőmérsékleten
2. 2 ml BM purple (Roche, 11442074001) hozzáadása a 100X (10 µl/ml koncentrációjú) törzsoldatból (50 mg/ml Levamisol, 10% Tween)
3. sötétben, szobahőn, rázatás közben hagyjuk kialakulni a színt, közben sztereomikroszkóp alatt óránként ellenőrizzük
4. fotókat készítünk (Nikon SMZ25 sztereomikroszkóp és Nikon NIS-Elements szoftver segítségével)

#### Felhasznált oldatok:

Az összes felhasznált oldatot ultratiszta DNáz / RNáz mentes desztillált vízből (GIBCO, 10977) készítjük el, melyekhez aztán DEPC-t (diethyl-pyrocabonate, Sigma D5758) adunk és autoklávozzuk. A Tween-20-at tartalmazó oldatokat leszűrjük és sterilen tartjuk.

#### PBT:

1X PBS + 0,1% Tween-20 (MP Biomedicals 9005-64-5)

#### Hibridizációs oldat:

50 % formamid

5X SSC (Invitrogen AM9763), pH=4,5 (citromsavval beállítva, Sigma C83155)

1% SDS (Serva P190117)

50 µg/ml élesztő tRNS

50 µg/ml heparin

#### I. számú oldat:

50 % formamid

5X SSC, pH=4,5

1% SDS

II. számú oldat:

50 % formamid

2X SSC, pH=4,5

birka szérum:

30 percig 70 °C-on inaktíváljuk

10X TBS (1 literhez)

80 g NaCl

2 g KCl

250 ml 1 M Tris-HCl, pH=7,4

TBST:

1X TBS + 0,1 % Tween-20

2 mM Levamisol (Sigma L9756)

100X Levamisol/Tween-20 törzsoldat:

10 % Tween-20

200 mM Levamisol (48 mg/ml)

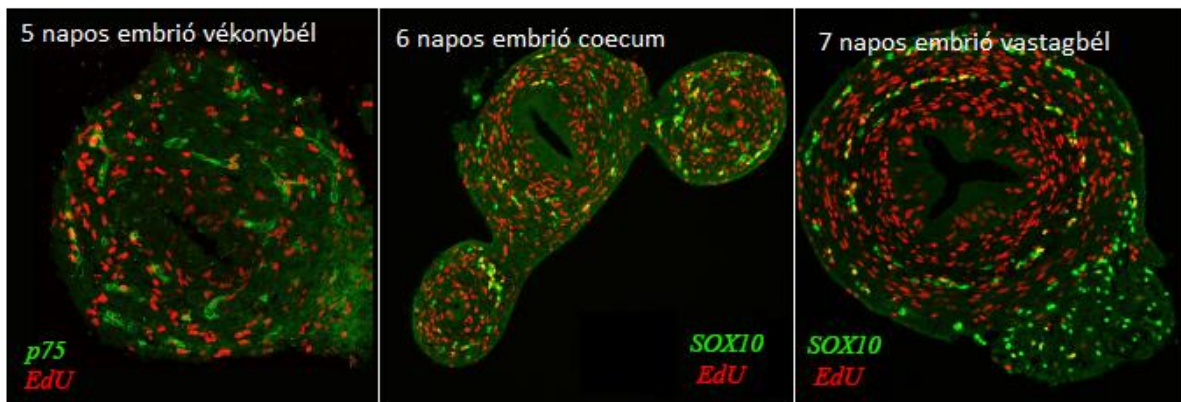
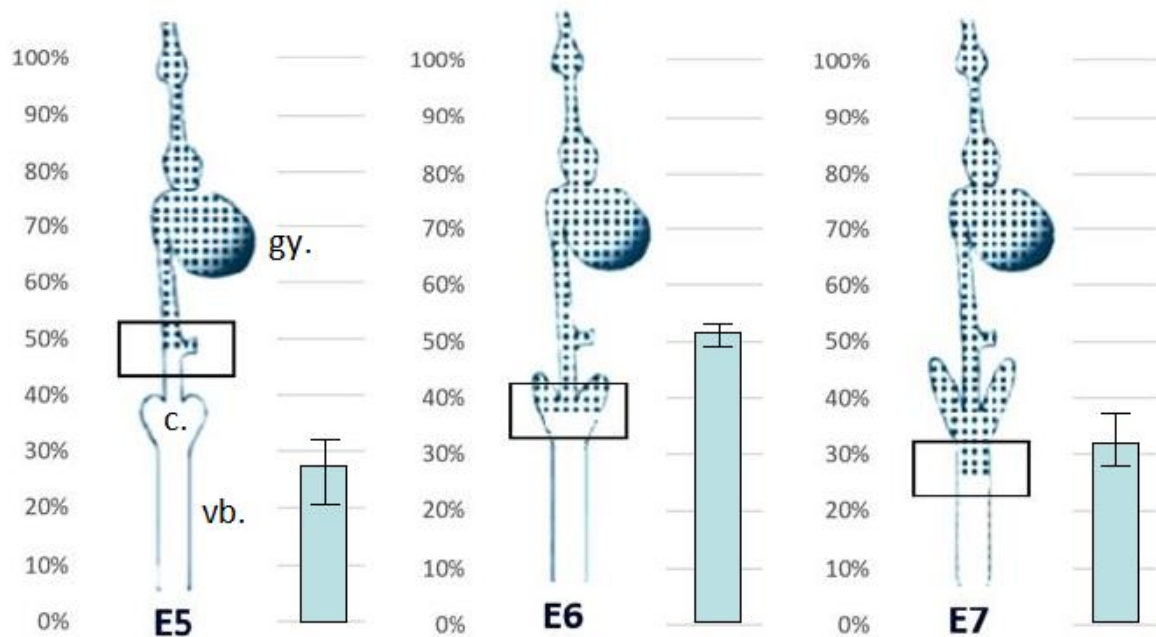
Embrió por készítése:

1. Megfelelő korú / stádiumú embriók izolálása, a pigmentált szervek (pl. szemek) és extraembrionális szövetmaradványok eltávolítása, majd az embriók minimális térfogatú jéghideg PBS-ben való homogenizálása.
2. 4X térfogatú jéghideg aceton hozzáadása, összekeverése és 30 perc inkubáció jégen.
3. A csövek centrifugálása 10 000 g-n 10 percig, a felülúszó leöntése és újabb jéghideg acetonos mosás után újabb centrifugálási lépés következik.
4. A pelleteket összegyűjtjük, szűrőpapíron kiszárítjuk, majd mozsárban finom porrá őröljük. A port -20 °C-on tároljuk.

## ***Eredmények és megvitatásuk***

### A sejtosztódás meghatározása a fejlődő bélidegrendszerben

Csirke embrióban a bélidegrendszer fejlődése az embrionális fejlődés harmadik napján veszi kezdetét, amikor a sejtek a proximális előbelet kolonizálják (2,5 E). A gyomor kolonizációja 2 nap elteltével (4,5 E) indul meg, a közép- és utóbél határán elhelyezkedő coecum telepek benépesítése pedig a 6. embrionális napon (5,5 E) történik meg. A teljes disztális utóbelet az embrionális fejlődés 8. napjára járják be a sejtek (8 E) (Nagy és mtsai., 2017). Munkám első lépése az volt, hogy meghatároztam a „wavefront” sejtek proliferációs mértékét, miközben a középbélből a coecumon keresztül áthaladtak a vastagbélbe. Kísérleteim során 5, 6 és 7 napos embriók coecumot tartalmazó közép- és utóbél szakaszait izoláltam, a proliferáció jelölésére EdU kit-et használtam, majd az embrionális szerveket fixáltam. Az így előkészített mintákból fagyasztott zselatinos blokkokat készítettem, lemetszettem és immunfluoreszcens festéseket végeztem rajtuk. A ganglionléc sejtek azonosítására Sox10, illetve p75 markereket használtam, míg az ún. „wavefront” helyzetének megállapítására az első differenciálódott Hu<sup>+</sup> neuronokat vettem alapul. A konfokális mikroszkópos felvételek segítségével ImageJ szoftver segítségével megszámláltam az EdU/p75, illetve EdU/Sox10 kettős pozitív, tehát az osztódó ganglionléc sejtek számát és összehasonlítottam az összes p75+/Sox10+ ganglionléc sejt számával. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a 6 napos embrióban, amikor a „wavefront” sejtek áthaladnak a coecum területén az osztódó sejtek nagyobb számban figyelhetők meg, kb. 20%-kal több proliferatív sejtet számláltam (6. ábra). Bár korábban egérben voltak hasonló kísérletek, melyek a proliferációs intenzitást elemezték (Young és mtsai., 2004), ilyen irányú vizsgálat, hogy a coecum területén milyen osztódási intenzitás figyelhető meg, nem történt meg. Ugyanakkor rendszeresen felvetődik az az elképzelés, hogy a megfelelő sejtszámnak fontos szerepe lehet az irányított sejtmigrációban és ennek egyik követelménye az elől haladó ganglionléc sejtek megfelelő sűrűsége. Ezek a megfigyelések fogalmazták meg a populációs-nyomás indukált sejtmigrációs hipotézist, ami szerint nagyszámú, intenzíven osztódó sejt szükséges az utóbél ganglionlécsejtes benépesüléséhez (Barlow és mtsai., 2008; Young és mtsai., 2004). A csirke embriókból kapott eredmények alapján feltételezhető, hogy a coecum a ganglionlécsejtek proliferációját serkentő funkciója miatt elengedhetetlen a vastagbél idegrendszerének kialakításában.

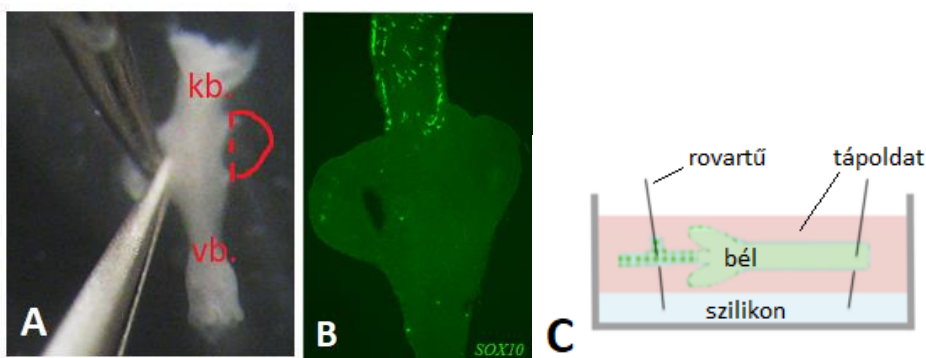


**6. ábra: Az első vonalbeli ganglionléc őssejtek proliferációjának összehasonlító vizsgálata**

**5-6 és 7 napos embrionális belek keresztmetszetein.** Az embrionális béltraktust bemutató sémás ábrákon a pontozott részek a ganglionléc sejtek által már kolonizált területeket mutatják. A bekeretezett szakaszok a kb. 400 µm hosszúságú „wavefront” területének felel meg. A coecum magasságába érve a ganglionléc őssejtek osztódási potenciálja fokozódik, ezt az ábrán százalékos értékben adtam meg (EdU+ ganglionléc sejt / összes ganglionléc sejt arányában) A konfokális mikroszkópos felvételek 1-1 reprezentatív képet mutatnak az adott stádiumból a „wavefront” területről (gy. – gyomor, c. – coecum, vb. – vastagbél).

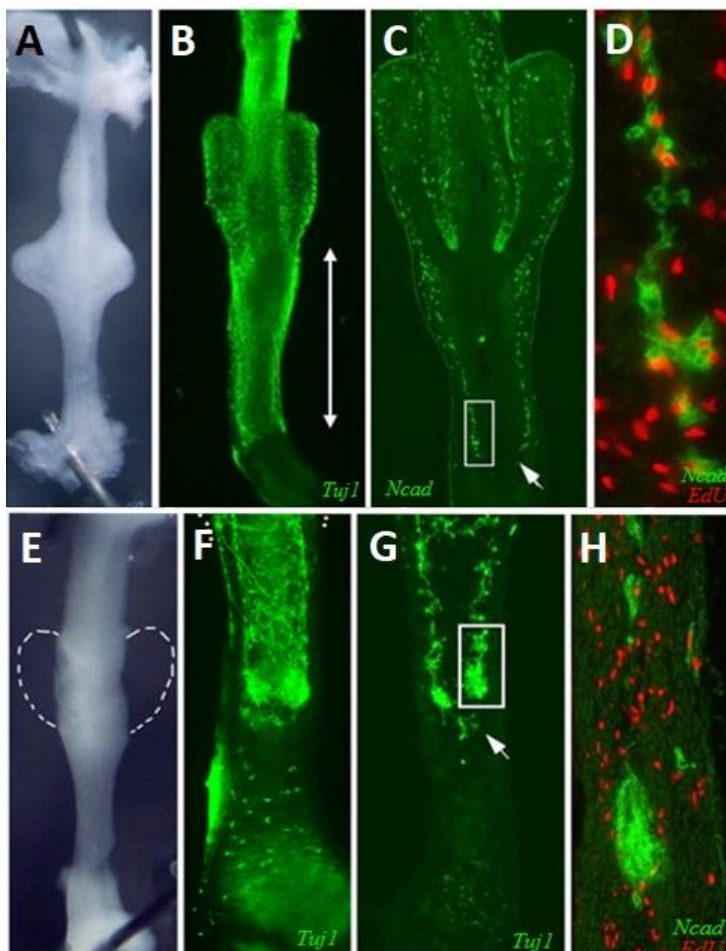
## A coecum eltávolításának hatása a fejlődő bélidegrendszerre

Munkám következő lépésében arra kerestem választ, hogy amennyiben a coecumot eltávolítjuk, megváltozik-e a vastagbél idegrendszerét kialakító ganglionléc sejtek kolonizációs képessége. Ennek érdekében steril körülmények között kipreparáltam 5 napos csirke embriók béltraktusát a gyomortól a kloákáig, majd szilikonnal feltöltött tenyésztő edényekben rovartűk segítségével a két végén rögzítettem a szervdarabokat. Sztereomikroszkóp alatt, mikrosebészeti eszközökkel a coecum telepeket eltávolítottam (coecum abláció, 7/A. ábra). Az eltávolítás előtt egy hasonló korú embrió segítségével hosszmetseten kimutattam, hogy az ablációt a ganglionléc őssejtek általi kolonizáció előtt végeztem el, a sejtek ekkor még nem léptek be a coecum területére (7/B. ábra). Ezáltal igazolni tudtam, hogy a kapott eredményeket nem az intenzíven osztódó, első vonalbeli sejtek („wavefront”) eltávolítása miatt kaptam. A kontroll és coecum abláción átesett beleket függesztett szervtenyészetekben tartottam 3 napig (7/C. ábra), majd szövettani feldolgozásra kerültek.



**7. ábra: Az ablációs kísérletek során használt kísérleti beállítás.** A coecum telepek eltávolítását mikrocseppek segítségével végeztem el (A). Sox10 immunfestés igazolja, hogy a vándorló dúlcéscellák a középbél disztális részét már kolonizálták, de a coecumot még nem népesítik be (B). A függesztett szervtenyésztés sematikus ábrázolása (C) (kb. – középbél, vb. – vastagbél, pirossal a már eltávolított coecum helyét jelöltem).

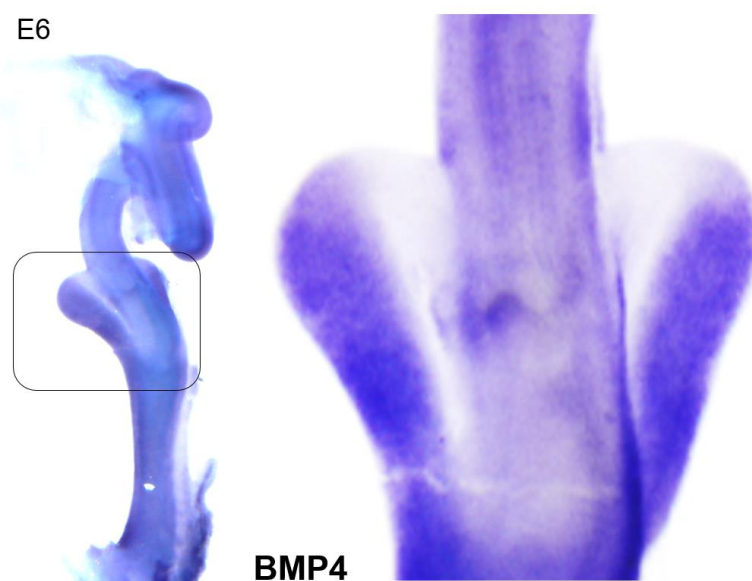
A függesztett szervtenyészeteket 72 óra inkubálás után fixáltam, előtte az explantátumokat EdU-val is kezeltem. Teljes szervi immunfestéssel (8. ábra/B, F), illetve hosszmetseten kettős immunfluoreszcenciával (8. ábra/C, G) is megvizsgáltam a tenyésztésen átesett kontroll és coecum ablált beleket. Azt az eredményt kaptam, hogy míg a kontroll belek kolonizációja normális mintázatot mutatott, a ganglionléc sejtek elérték a disztális utóbélszakaszt. A coecum abláción átesett belek esetében a ganglionléc sejtek nem voltak képesek megfelelően kolonizálni a vastagbelet, migrációjuk korán megállt, sejtaggregátumok keletkeztek, melyek ráadásul a korai differenciáció jeleit mutatták, az itt található sejtek közül már csak igen kevés volt képes osztódásra (8. ábra/H). Kontroll tenyészetek esetében az első vonalbeli sejtek osztódása a 7-8 napos embrióban megfigyelt „wavefront” sejtekre jellemzően intenzív volt (8. ábra/D). A coecum abláció eredményeként kapott aganglionotikus fenotípus nagyon hasonlít egy humán veleszületett neurointesztinális betegséghez, a Hirschsprung-kórhoz, aminek hátterében feltehetőleg az intenzív osztódásra képes sejtpopuláció redukciója áll.



**8. ábra: Kontroll (A-D) és coecum abláción átesett (E-H) embrionális belek függesztett szervtenyészetei és az abból kapott eredmények bemutatása.** (A) 5 napos embrionális bél a tenyésztés előtt, (B,C) a bélidegrendszer elemeinek normális megjelenése a kolonizáció során whole mount immunfestéssel (TuJ1 korai neuron marker) és hosszmetseten (N-cadherin, ganglionléc sejt marker) kimutatható. (E) 5 napos coecum abláción átesett béldarab a tenyésztés előtt, (F,G) A coecum ablációt és tenyésztés követő whole mount immunfestéssel és hosszmetseti képen rendellenes bélidegrendszer figyelhető meg. (D,H) A kontroll és ablált beleken (C és G ábrán bekeretezett területeken) a ganglionléc sejtek osztódását EdU-val vizsgáltam.

## A BMP4 expressziója a coecum telepében

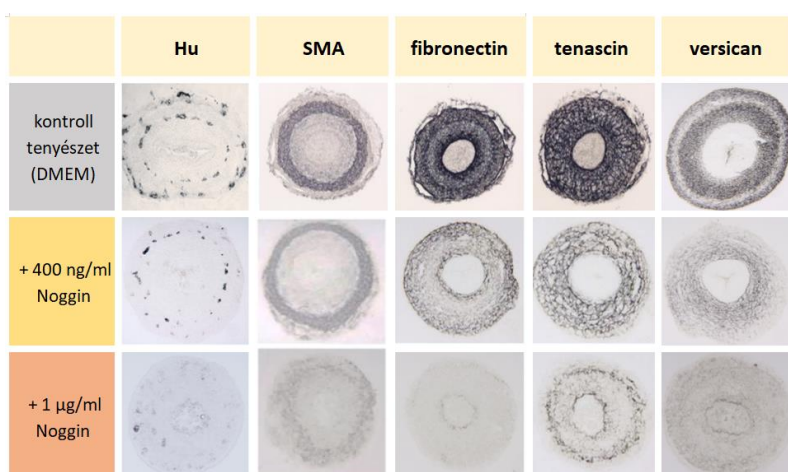
A sejtek proliferációját számos tényező befolyásolja, de elsősorban a mesenchymalis faktorok játszanak ebben fontos szerepet. A következőkben így egy jól ismert, a bélidegrendszer fejlődésében is fontos szerepet játszó mesenchymalis növekedési faktort vizsgáltam meg. A *BMP4* morfogén lehetséges szerepére egy E6,5 korú embrióból készült whole mount in situ hibridizációs kép irányította figyelmünket, melyen a coecum területén erős expresszió figyelhető meg (Nielsen és mtsai., 2001). Korábbi *in vitro* adatok már ismertek voltak, mely szerint a *BMP4* befolyásolja a sejt vándorlást és a differenciációt is (Fu és mtsai., 2006; Goldstein és mtsai., 2005). Összhangban az előbb bemutatott proliferációs és coecum ablációs kísérleteim eredményeivel, felmerült annak a lehetősége, hogy a coecum telepeiben kifejeződő *BMP4* morfogén kritikus szerepet játszik a ganglionlécsejtek osztódása és vándorlása idején. 6 napos embrionális bél in situ hibridizációs vizsgálata során azt kaptam, hogy a bélidegrendszer fejlődésének kritikus stádiumában (amikor a ganglionléc sejtek vándorlásuk során kolonizálják az embrionális coecumot) a BMP4 bár kifejeződik a bél teljes hosszában, a coecumban intenzív expressziót mutat (9. ábra). Ennek megfelelően fontos szerepe lehet a vastagbél idegrendszerének kialakításában is. Kísérleteimet technikai akadályok miatt csak 6 napos embrióból izolált szervdarabokon tudtam elvégezni. Az elöl haladó („wavefront”) sejtek kolonizációjának követése szempontjából a további stádiumok (5E és 7E) vizsgálata is szükséges lenne. A felhasznált RNS-próba készítése több nehézségbe ütközött: problémám volt a restrikciós enzimekkel, polimerázzal és a túlhívással is. Jelenleg ezeknek a technikai hibáknak a kiküszöbölésén dolgozom. Ezeket a kísérleteket a nyár folyamán Pascal de Santa Barbara laboratóriumában (Montpellier, Franciaország) lesz lehetőségem elvégezni.



**9. ábra: „Whole mount” in situ hibridizációs eredmények.**  
A BMP4 génjének expressziós mintázatát sötétkék színreakció rajzolja ki.

## A BMP jelávitel gátlása és szerepe a bélidegrendszer fejlődésében

A „whole mount” in situ hibridizációs eredményeink szerint a BMP4 génje a gasztrointesztinális traktus és a bélidegrendszer fejlődésének szempontjából kritikus stádiumokban és helyeken volt aktív. Ennek a tanulmányozására a BMP-jelátvitelt a tenyészetekben blokkoltuk noggin fehérje különböző koncentrációkban való hozzáadásával (400 ng/ml és 1 µg/ml; az alkalmazott koncentrációkat Goldstein és mtsai. 2005 nyomán állapítottam meg). 5 napos kontroll tenyészetben tartott vastagbél keresztmetszeteit három napos tenyésztés után vizsgáltam chloronaftolos immuncitokémia segítségével. Ez idő alatt a bélidegrendszert létrehozó sejtek bevándoroltak a bél mesenchymájába és normális extracelluláris mintázat alakult ki: a fibronectin és tenascin expressziója diffúz festődést mutatott, ahol a fibronectin intenzívebben jelölődött a hám alatti mesenchymában. A noggin kezelt belek esetében a bél radiális szimmetriáját a simaizom marker (SMA) mintázata alapján ellenőriztem, mely alapvetően nem borult fel. A neuron marker (Hu) festéskor viszont csak elszórtan találtam sejteket a bél falban, ami arra enged következtetni, hogy noggin hozzáadása esetén hipoganglionózissal, súlyosabb esetben pedig a coecum ablációs kísérletben is megfigyelt disztális aganglionózissal találkozunk. Az olyan extracelluláris mátrixfehérjék expressziója, melyek a sejt vándorlást serkentik (fibronectin, tenascin) (Newgreen és mtsai. 1980, Nagy és Goldstein 2006a, Akbareian és mtsai. 2013), erősen lecsökkennek. A Hirschsprung-kórban és a hozzá asszociált fejlődési hibák hátterében ehhez hasonló változások figyelhetők meg: a kollagének (kollagén-IV), proteoglikánok és glikoproteinek (laminin, fibronectin, tenascin, nidogen) expressziós mintázata megváltozik ezekben a kórképekben: a kollagén-IV és laminin erősebben, míg a nidogen gyengébben fejeződött ki az érintett bélszakaszokon (Fujimoto és mtsai., 1989; Parikh és mtsai., 1995, 1994; Parikh, Tam, Lloyd és mtsai., 1992; Parikh, Tam, Van Velzen és mtsai., 1992).



**10. ábra: A noggin kezelés hatása a disztális utóbélre, különös tekintettel annak extracelluláris mintázatára. A sejt vándorlást segítő mátrixfehérjék expressziója lecsökkent.**



## ***Következtetések***

Kísérleti munkám célkitűzése az volt, hogy feltárjam a coecum szerepét a bélidegrendszer fejlődésében, tanulmányozzam a coecumba vándorló ganglionléc sejtek proliferációját, illetve bemutassam a BMP4 expresszió szerepét a bélidegrendszer fejlődése során. Sikeresen megvizsgáltam és karakterizáltam csirke embrióban az elől haladó ganglionlécsejtek („wavefront”) proliferációs aktivitását a közép- és utóbél, illetve coecum telepek kolonizációja során. A proliferációs eredményeim és az irányított migrációs hipotézis alapján a coecum szerepe elengedhetetlen a ganglionléc sejtek vándorlása szempontjából. Coecum hiányában a sejtek vándorlási kapacitása idejekorán kimerül, így az embrionális vastagbél teljes kolonizációja nem történik meg, aganglionotikus colorectum alakul ki. A coecum telepében kapott *BMP4* morfogén szignál hatására a ganglionléc sejtek száma megnő, így képesek a disztálisabb bélszakasz kolonizációjára. Jövőbeni terveim közt szerepel az *in situ* hibridizációs kísérleteknek a ganglionléc sejtek vándorlásának korábbi és későbbi stádiumaiban való megisméltése és a BMP-szignalizáció aktivitásának igazolása p-Smad (Smad1/5/8) immunfestéssel.

Coecum abláció és szervtenyésztés módszerével igazolni tudtam a coecum esszenciális szerepét a vastagbél idegrendszerének kialakításában. Az embrionális coecum korai irtása a Hirschsprung-kórhoz hasonló fenotípust alakít ki. A coecum ganglionlécsejtek általi kolonizációját transzgenikus, zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló (GFP) csirke embrió (Roslin Institute, University of Edinburgh) (McGrew és mtsai., 2004) segítségével szöveti rekombinációs technikát alkalmazva vagy fluoreszcens karbocianin (DiI) coecumba való mikroinjektálásával tervezem megvizsgálni.

A *BMP* mesenchymalis növekedési faktor a coecumban fejeződik ki először. *In situ* hibridizáció és BMP inhibitor jelenlétében történő szervtenyésztés alapján feltételezhető, hogy a jelátvitel coecumban betöltött szerepe kiemelkedő. Ennek igazolására további *in vitro* és *in ovo* kísérleteket tervezek a jövőben, így a noggin gátló hatását lokálisan, mikroinjektálással vagy a rekombináns fehérjébe áztatott mikrogyöngyök segítségével, illetve a BMP szignalizáció virális vektorral (RCAS) való gátlásával. Noggin kezelés hatására megváltozik a bél extracelluláris mintázata. A mátrix komponensei folyamatos kölcsönhatásban vannak az embrionálisan fejlődő szervek őssejtjeivel, így a jövőbeni őssejt transzplantációs eljárások kidolgozása szempontjából elengedhetetlen a befogadó mikrokörnyezet megfelelő ismerete.

Feltételezzük tehát, hogy az embrionális coecum organizátor központként működik a bélidegrendszer fejlődése során, ahol a BMP4-et kifejező coecum területén áthaladó sejtek intenzív osztódási képességre tesznek szert és ezek a sejtek felelősek az utóbél kolonizációjáért.

## **Összefoglalás**

A gastrointestinalis rendszer fejlődése során ganglionléc eredetű sejtek vándorolnak a bélcső mesenchymájába, ahol a bélidegrendszert (ENS) alkotó myentericus és submucosalis plexust hozzák létre. Ha az embrionális fejlődés során az enterális ganglionléc sejtek vándorlása zavart szenved, akkor az aganglionozissal jellemzett Hirschsprung-kór alakul ki. ENS-t célzó kutatások szerint az embrionális coecumból származó növekedési faktorok fontos szerepet játszanak a vastagbél idegrendszerének ontogenezisében. Embriómanipulációs vizsgálatok eredményei felvetik annak lehetőségét, hogy a *BMP4* nevű növekedési faktor először a coecumban, majd a bél teljes szakaszán fejeződik ki és a vastagbél idegi plexusainak kialakulásában játszik szerepet. Munkánk során olyan szervtenyésztési módszert alkalmaztunk, amelyben *in vitro* lehet vizsgálni a BMP jelátvitelt blokkoló Noggin növekedési faktor ENS-re kifejtett hatását. Kísérleteinkhez 5 napos csirke embriókból izolált bélszakaszokat használtunk. Korábban végzett immuncitokémiai vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a ganglionléc sejtek populációja ebben a stádiumban éri el a coecum telepét. Az izolált béldarabokat 48 óráig tenyésztettük, a tápoldatba előzetesen Noggin fehérjét oldottunk. A kezelés hatására a ganglionléc sejtek vándorlása megállt, s a néhány sejtből álló myentericus és submucosalis ganglionok csak a proximális vastagbél szakaszon alakultak ki. Megfigyeltük továbbá, hogy amint a dúcléc sejtekből származó őssejtek a bél falban vándorolnak és a coecum telepébe érnek, az ún. területfoglaló sejtek proliferációja megnő. Amikor mikrosebészeti módszerekkel eltávolítottuk a coecumot és az abláción átesett béldarabokat tovább tenyésztettük, rendellenes ENS alakult ki. Eredményeink azt mutatják, hogy a BMP jelátvitel zavara a csirke embrionális béltenyészetekben a vastagbél ENS rendellenes fejlődését eredményezi, amelynek fenotípusa a hypo- és aganglionozissal járó humán Hirschsprung-kórra hasonlít.

## ***Summary***

During the gastrointestinal tract development neural crest derived cells migrate into the gut's mesenchyme where they form the enteric nervous system (ENS) components: submucosal and myenteric plexuses. If the enteric neural crest (NC) migration is perturbed in the developing embryo, aganglionic colon and Hirschsprung's disease (HD) is formed. According to the earlier enteric nervous system research, embryonic ceca derived factors play an important role in the development of colonic nervous system. Embryo manipulation studies showed that the *BMP4* morphogenetic factor occurs firstly in the ceca, later along the gut and plays a role in the normal development of plexuses. In our work we developed an organ culture technique, where we can observe the effect of a BMP antagonist, Noggin in the developing enteric nervous system. The organ explants were 5 days old embryonic gut segments. According to our former immunohistochemical (IHC) results, the population of neural crest cells begin to colonize the ceca in this stage. The isolated gut segments were cultured 48 hours long. To the treatment the migration of neural crest cells stopped and the myenteric and submucosal ganglia occurred just at the proximal colon. We have also observed, as soon as the „wavefront” cells (stem cells of the migrating neural crest derived cells) reached the ceca their proliferation increased. When we microsurgically ablated the ceca and these guts were cultured as earlier, abnormal enteric nervous system developed. Our results show, that the disturbed BMP signaling in chicken embryonic gut cultures eventuate irregular enteric nervous system development, which phenotype is very similar to hypo- and aganglionic colon and Hirschsprung's disease.

## **Hivatkozások**

Barlow A. J., Wallace A. S., Thapar N. és Burns A. J. (2008): **Critical numbers of neural crest cells are required in the pathways from the neural tube to the foregut to ensure complete enteric nervous system formation.** *Development.* 135. 1681–1691.

Bolande R. P. (1997): **Neurocristopathy: its growth and development in 20 years.** *Pediatric pathology & laboratory medicine* 17, 1.: 1–25.

Bronner Marianne E., és LeDouarin Nicole M. (2012): **Development and evolution of the neural crest: an overview.** *Developmental biology.* 366, 1.: 2–9. ISSN: 1095-564.

Bronner Marianne E., és Simões-Costa Marcos (2016): **The Neural Crest Migrating into the Twenty-First Century.** *In: Current Topics in Developmental Biology.* 116. 115–134.

Brookes S. J. (2001): **Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine.** *The Anatomical record.* 262, 1.: 58–70.

Burns Alan J., Delalande Jean-Marie M. és Le Douarin Nicole M. (2002): **In ovo transplantation of enteric nervous system precursors from vagal to sacral neural crest results in extensive hindgut colonisation.** *Development.* 129, 12.: 2785–96.

Chalazonitis A., D’Autréaux Fabien, Guha Udayan, Pham Tuan D., Faure Christophe, Chen Jason J., Roman Daniel, Kan Lixin, Rothman Taube P., Kessler John A. és Gershon Michael D. (2004): **Bone Morphogenetic Protein-2 and -4 Limit the Number of Enteric Neurons But Promote Development of a TrkC-Expressing Neurotrophin-3-Dependent Subset.** *Journal of Neuroscience.* 24, 17.: 4266–4282.

Chalazonitis A., D’Autreaux F., Pham T. D., Kessler J. A. és Gershon M. D. (2011): **Bone morphogenetic proteins regulate enteric gliogenesis by modulating ErbB3 signaling.** *Dev Biol.* 350. 64–79.

Chalazonitis A., Pham T. D., Li Z., Roman D., Guha U., Gomes W., Kan L., Kessler J. A. és Gershon M. D. (2008): **Bone morphogenetic protein regulation of enteric neuronal phenotypic diversity: relationship to timing of cell cycle exit.** *J Comp Neurol.* 509. 474–492.

Chalazonitis A., Pham T. D., Rothman T. P., DiStefano P. S., Bothwell M., Blair-Flynn J., Tessarollo L. és Gershon M. D. (2001): **Neurotrophin-3 is required for the survival-differentiation of subsets of developing enteric neurons.** *The Journal of neuroscience* 21, 15.: 5620–36.

Chalazonitis A., és Kessler John A. (2012): **Pleiotropic effects of the bone morphogenetic proteins on development of the enteric nervous system.** *Developmental Neurobiology.* 72, 6.: 843–856.

D’Autreaux F., Margolis K. G., Roberts J., Stevanovic K., Mawe G., Li Z., Karamooz N., Ahuja A., Morikawa Y., Cserjesi P., Setlick W. és Gershon M. D. (2011): **Expression level of Hand2 affects specification of enteric neurons and gastrointestinal function in mice.** *Gastroenterology.* 141. 576–87, 587.

De Santa Barbara Pascal, Williams Jerrell, Goldstein A. M., Doyle Adele M., Nielsen Corinne, Winfield Sarah, Faure Sandrine és Roberts Drucilla J. (2005): **Bone morphogenetic protein signaling pathway plays multiple roles during gastrointestinal tract development.** *Developmental dynamics* 234, 2.: 312–322.

Dora David, Arciero Emily, Hotta Ryo, Barad Csilla, Bhawe Sukhada, Kovacs Tamas, Balic Adam, Goldstein A. M. és Nagy Nandor (2018): **Intraganglionic macrophages: a new population of cells in the enteric ganglia.** *Journal of Anatomy*. 233, 4.: 401–410.

Druckenbrod Noah R., és Epstein Miles L. (2005): **The pattern of neural crest advance in the cecum and colon.** *Developmental biology*. 287, 1.: 125–33.

Etchevers Heather C., Amiel Jeanne és Lyonnet Stanislas (2006): **Molecular bases of human neurocristopathies.** *Advances in experimental medicine and biology*. 589. 213–34.

Fu M., Lui V. C., Sham M. H., Pachnis V. és Tam P. K. (2004): **Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut.** *J Cell Biol*. 166. 673–684.

Fu M., Vohra Bhupinder P. S., Wind Daniel és Heuckeroth Robert O. (2006): **BMP signaling regulates murine enteric nervous system precursor migration, neurite fasciculation, and patterning via altered Ncam1 polysialic acid addition.** *Developmental Biology*. 299, 1.: 137–150.

Fujimoto T., Hata J., Yokoyama S. és Mitomi T. (1989): **A study of the extracellular matrix protein as the migration pathway of neural crest cells in the gut: analysis in human embryos with special reference to the pathogenesis of Hirschsprung's disease.** *Journal of pediatric surgery*. 24, 6.: 550–6.

Furness J. B., és Costa M. (1980): **Types of nerves in the enteric nervous system.** *Neuroscience*. 5, 1.: 1–20.

Goldstein A. M., Hofstra R. M. és Burns A. J. (2013): **Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system.** *Clin Genet*. 83. 307–316.

Goldstein A. M., Brewer Katherine C., Doyle Adele M., Nagy Nandor és Roberts Drucilla J. (2005): **BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system.** *Mechanisms of Development*. 122, 6.: 821–833.

Goldstein A. M., és Nagy Nandor (2008): **A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo.** *Pediatric research*. 64, 4.: 326–33.

Guillemot F., Lo L. C., Johnson J. E., Auerbach A., Anderson D. J. és Joyner A. L. (1993): **Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons.** *Cell*. 75, 3.: 463–76.

Gunn M. (1951): **A study of the enteric plexuses in some amphibians.** *The Quarterly journal of microscopical science*. 92, 1.: 55–77.

Heanue T. A., és Pachnis V. (2007): **Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies.** *Nat Rev Neurosci*. 8. 466–479.

His W. (1868): **Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbelthierleibes. Die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei.** *Vogel*.

Hutson Mary R., és Kirby Margaret L. (2007): **Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations.** *Seminars in cell & developmental biology*. 18, 1.: 101–10.

Kapur R. P. (1999): **Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos.** *Pediatric and developmental pathology* 2, 6.: 559–69.

Kapur R. P. (2000): **Developmental disorders of the enteric nervous system.** *Gut*. 47 Suppl 4, 90004.: iv81-3; discussion iv87.

Kirchgessner A. L., és Gershon M. D. (1990): **Innervation of the pancreas by neurons in the gut.** *The Journal of neuroscience*. 10, 5.: 1626–42.

Kuo Bryan R., és Erickson Carol A. (2010): **Regional differences in neural crest morphogenesis.** *Cell adhesion & migration*. 4, 4.: 567–85.

Lamanna C., Costagliola A., Vittoria A., Mayer B., Assisi L., Botte V. és Cecio A. (1999): **NADPH-diaphorase and NOS enzymatic activities in some neurons of reptilian gut and their relationships with two neuropeptides.** *Anatomy and embryology*. 199, 5.: 397–405.

Lang D., Chen F., Milewski R., Li J., Lu M. M. és Epstein J. A. (2000): **Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret.** *The Journal of clinical investigation*. 106, 8.: 963–71.

Le Douarin N. M., és Teillet M. A. (1973): **The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo.** *Journal of embryology and experimental morphology*. 30, 1.: 31–48.

Le Douarin N. M. (2004): **The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story.** *Mechanisms of Development*. 121, 9.: 1089–1102.

Le Guen L., Notarnicola C. és de Santa Barbara P. (2009): **Intermuscular tendons are essential for the development of vertebrate stomach.** *Development*. 136, 5.: 791–801.

Lei J., és Howard M. J. (2011): **Targeted deletion of Hand2 in enteric neural precursor cells affects its functions in neurogenesis, neurotransmitter specification and gangliogenesis, causing functional aganglionosis.** *Development*. 138. 4789–4800.

McGrew Michael J., Sherman Adrian, Ellard Fiona M., Lillico Simon G., Gilhooley Hazel J., Kingsman Alan J., Mitrophanous Kyriacos A. és Sang Helen (2004): **Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors.** *EMBO reports*. 5, 7.: 728–33.

Memic Fatima, Knoflach Viktoria, Sadler Rebecca, Tegerstedt Gunilla, Sundström Erik, Guillemot Francois, Pachnis Vassilis és Marklund Ulrika (2016): **Ascl1 Is Required for the Development of Specific Neuronal Subtypes in the Enteric Nervous System.** *The Journal of neuroscience*. 36, 15.: 4339–50.

Moniot B., Biau Sandrine, Faure Sandrine, Nielsen Corinne M., Berta Philippe, Roberts Drucilla J. és de Santa Barbara Pascal (2004): **SOX9 specifies the pyloric sphincter epithelium through mesenchymal-epithelial signals.** *Development.* 131, 15.: 3795–3804.

Nagashimada Mayumi, Ohta Hiroshi, Li Chong, Nakao Kazuki, Uesaka Toshihiro, Brunet Jean-François, Amiel Jeanne, Trochet Delphine, Wakayama Teruhiko és Enomoto Hideki (2012): **Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression.** *The Journal of clinical investigation.* 122, 9.: 3145–58.

Nagy N, Brewer K. C., Mwizerwa O. és Goldstein A. M. (2007): **Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system.** *Dev Dyn.* 236. 73–83.

Nagy N., Magyar A. és Oláh I. (2001): **A novel monoclonal antibody identifies all avian embryonic myogenic cells and adult smooth muscle cells.** *Anatomy and embryology.* 204, 2.: 123–34.

Nagy N., Burns Alan J. és Goldstein A. M. (2012): **Immunophenotypic characterization of enteric neural crest cells in the developing avian colorectum.** *Developmental dynamics.* 241, 5.: 842–51.

Nagy N., és Goldstein A. M. (2017): **Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon.** *Seminars in Cell & Developmental Biology.*

Nagy N., és Goldstein A. M. (2006a): **Intestinal coelomic transplants: a novel method for studying enteric nervous system development.** *Cell and tissue research.* 326, 1.: 43–55.

Nagy N., és Goldstein A. M. (2006b): **Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system.** *Developmental biology.* 293, 1.: 203–17.

Nielsen C., Murtaugh L. C., Chyung J. C., Lassar A. és Roberts D. J. (2001): **Gizzard formation and the role of Bapx1.** *Developmental biology.* 231, 1.: 164–74.

Parikh D. H., Leibl M., Tam P. K. és Edgar D. (1995): **Abnormal expression and distribution of nidogen in Hirschsprung's disease.** *Journal of pediatric surgery.* 30, 12.: 1687–93.

Parikh D. H., Tam P. K., Lloyd D. A., Van Velzen D. és Edgar D. H. (1992): **Quantitative and qualitative analysis of the extracellular matrix protein, laminin, in Hirschsprung's disease.** *Journal of pediatric surgery.* 27, 8.: 991–6.

Parikh D. H., Tam P. K., Van Velzen D. és Edgar D. (1992): **Abnormalities in the distribution of laminin and collagen type IV in Hirschsprung's disease.** *Gastroenterology.* 102, 4 Pt 1: 1236–41.

Parikh D. H., Tam P. K., Van Velzen D. és Edgar D. (1994): **The extracellular matrix components, tenascin and fibronectin, in Hirschsprung's disease: an immunohistochemical study.** *Journal of pediatric surgery.* 29, 10.: 1302–6.

Schemann Michael (2005): **Control of gastrointestinal motility by the „gut brain”; - the enteric nervous system.** *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* 41 Suppl. S4-6.

- Southard-Smith E. M., Kos L. és Pavan W. J. (1998): **Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model.** *Nature genetics.* 18, 1.: 60–4.
- Stemple D. L., és Anderson D. J. (1992): **Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest.** *Cell.* 71, 6.: 973–85. I
- Timmermans J. P., Hens J. és Adriaensen D. (2001): **Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans.** *The Anatomical record.* 262, 1.: 71–8.
- Wallace A. S., és Burns A. J. (2005): **Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract.** *Cell Tissue Res.* 319. 367–382.
- Yntema C. L., és Hammond W. S. (1954): **The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo.** *The Journal of comparative neurology.* 101, 2.: 515–41.
- Young H. M., Bergner A. J., Anderson R. B., Enomoto H., Milbrandt J., Newgreen D. F. és Whittington P. M. (2004): **Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut.** *Developmental biology.* 270, 2.: 455–73.
- Zhang X., Stappenbeck Thaddeus S., White Andrew C., Lavine Kory J., Gordon Jeffrey I. és Ornitz David M. (2006): **Reciprocal epithelial-mesenchymal FGF signaling is required for cecal development.** *Development.* 133, 1.: 173–180.
- Zhu Lei, Lee Hyung-Ok, Jordan ChaRandle S., Cantrell V. Ashley, Southard-Smith E. Michelle és Shin Myung K. (2004): **Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors.** *Nature genetics.* 36, 7.: 732–7.



## ***Köszönetnyilvánítás***

Köszönetet mondok témavezetőimnek, Dr. habil. Nagy Nándornak és belső konzulensemnek, Dr. Molnár Kingának segítőkész támogatásukért, illetve a dolgozatom alapos és kritikus átnézéséért. Köszönöm a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet Össejt- és Kísérletes Embriológia laboratórium minden tagjának, hogy saját munkájuk mellett engem is támogattak. Külön köszönöm Dr. Barad Csilla, Dr. Dóra Dávid és Orbán Lili segítségét. Munkám hozzáértésük és segítőkészségük nélkül nem jöhetett volna létre. Köszönöm továbbá családomnak és páromnak a munka elkészítése során tanúsított türelmüket és támogató szavaikat.

# NYILATKOZAT

Név: Kovács Tamás

ELTE Természettudományi Kar, szak: Biológus M.Sc.

Neptun azonosító: E3K62M

Diplomamunka címe: A coecum szerepe a bélidegrendszer fejlődésében

A diplomamunka szerzőjeként fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy a dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések standard szabályait következetesen alkalmaztam, mások által írt részeket a megfelelő idézés nélkül nem használtam fel.

Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül,
- tartalmi hivatkozás a forrás megjelölése nélkül,
- más személy publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Kijelentem továbbá, hogy a diplomamunka leadott nyomtatott példányai és elektronikus változata szövegükben, tartalmukban megegyeznek.

Budapest, 2019. május 17.



---

*a hallgató aláírása*