

**Universitatea Babeş-Bolyai**  
**Facultatea de Biologie și Geologie**  
**Departamentul de Biologie și Ecologie al Liniei Maghiare**  
**Specializarea Biologie**

LUCRARE DE LICENȚĂ

# **Rolul factorului morfogenetic mesenchymal BMP-4 în dezvoltarea embrionară a sistemului nervos enteric**

**Absolvent:**

**Pethő Csongor – László**

Universitatea Babeş-Bolyai , Facultatea de Biologie și Geologie, Specializarea Biologie

**Conducător științific:**

**Dr. habil Nagy Nándor**, conferențiar universitar  
Universitatea Semmelweis, Budapesta

**Consultant științific:**

**Dr. Kósa Ferenc**, conferențiar universitar  
Universitatea Babeş-Bolyai , Facultatea de Biologie și Geologie

CLUJ-NAPOCA, 2021

**Babeş-Bolyai Tudományegyetem  
Biológia és Geológia Kar  
Magyar Biológiai és Ökológiai Intézet  
Biológia szak**

**ÁLLAMVIZSGA DOLGOZAT**

**A mesenchymális eredetű BMP-4  
növekedési faktor szerepe a bélidegrendszer  
embrionális fejlődésében**

**Hallgató:**

**Pethő Csongor – László**

Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Biológia és Geológia Kar,  
Magyar Biológiai és Ökológiai Intézet, Biológia szak

**Témavezető:**

**Dr. Nagy Nándor**, habilitált egyetemi docens  
Semmelweis Egyetem, Budapest, Általános Orvostudományi Kar,  
Antómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

**Tudományos Konzulens:**

**Dr. Kósa Ferenc**, egyetemi docens  
Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Biológia és Geológia Kar

KOLOZSVÁR, 2021

## Tartalomjegyzék

I. Bevezetés .....	4
II. Irodalmi áttekintés .....	5
2.1 A bélidegrendszer általános felépítése.....	5
2.3 A bélidegrendszer embrionális fejlődése.....	9
2.4.1 A Hirschprung-kór kialakulásának molekuláris háttere.....	15
2.5 A BMP-jelátvitel szerepe a bélidegrendszer fejlődésében.....	17
III. Célkitűzések .....	19
IV. Anyagok és módszerek .....	20
4.1 Kísérleti állatok .....	20
4.2 A szöveti minták feldolgozása .....	20
4.2.1 Az embriók béltraktusának izolálása .....	20
4.2.2 Zselatinos-szacharózos fagyasztott blokk készítése .....	20
4.3 Fagyasztott metszetek készítése .....	21
4.4 Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia.....	21
4.4.1 Immunhisztokémia – Chloronaftolos immunfestés .....	21
4.4.2 Immunfluoreszcencia .....	22
4.5 Embriómanipuláció .....	24
4.5.1 Függesztett embrionális szervtenyészetek .....	24
4.5.3 Sejtenyészet fibronektinnel bevont felszínen.....	27
4.6 In situ hibridizáció.....	27
4.7 Metszetek értékelése, képkészítés, képfeldolgozás, dokumentáció .....	28
V. Eredmények és kiértékelésük .....	29
5.1 A BMP-4 expressziós mintázatának vizsgálata az utóbél fejlődése során.....	29
5.2 A BMP-4 jelátvitel bélidegrendszer fejlődésére kifejtett hatásának vizsgálata ex vivo szervtenyészeteken .....	31
5.4 A BMP-4 jelátvitel hatása az ENCC sejtek migrációjára 3D kollagén-gél tenyészetekben.....	35
5.5 A BMP-4 növekedési faktor közvetlen hatása a ganglionléc-eredetű sejtekre in vitro sejtenyészetben.....	36
VI. Következtetések levonása .....	38
Köszönetnyilvánítás .....	40
Irodalom .....	40

## I. Bevezetés

Az orvostudományban nagyon sokáig élt az a gondolat, hogy az agy egyeduralkodóként szabályozza az egész szervezetet és hangolja össze belső működéseit. Az utóbbi években egyre inkább kezd elterjedni az a nézet, hogy létezik egy “második agy” is, ami a központi idegrendszertől (*central nervous system – CNS*) egy nagymértékben független neurális rendszer, idegsejtjeinek száma meghaladja a gerincvelőben található neuronok számát. Ez, a gasztrointesztinális traktust behálózó rendszer, a bélidegrendszer (*enteric nervous system – ENS*), ami a bélcsatorna összetett működését szabályozza.

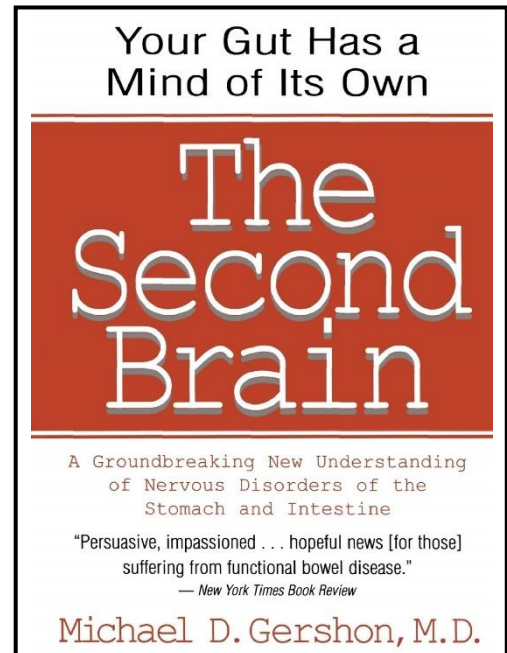
A bélidegrendszer a gyomor és bél falában található neuronok és gliasejtek kiterjedt hálózata, a perifériás idegrendszer legnagyobb részét képezi. Ez a komplex hálózat felelős a gasztrointesztinális traktus szekréciójának, abszorpciójának és motilitásának koordinálásáért. A bélidegrendszert kialakító őssejtek a velőcső dorzális részéből származnak, melyek a neuroepitheliumból leválva útjukat a bél felé folytatják és migrációjuk során benépesítik a béltraktus teljes hosszát. A sejtek kolonizációja során folyamatos migráció, osztódás és differenciáció történik, amelyek tökéletes összehangolása alakítja ki a bélidegrendszert. Abban az esetben, ha a felsorolt folyamatokban bármilyen zavar lép fel, az a bélidegrendszer rendellenes fejlődését okozza.

A Hirschprung-kór, az egyik legismertebb patológiás kórkép a bélidegrendszer rendellenes fejlődésére, melynek gyógyítása a klinikumnak még mai napig kihívásokat okoz, ugyanis jelenleg csak az érintett bélszakasz sebészi úton való eltávolítása az egyetlen megoldás. Pontosan ezért a klinikum felismerte a regeneratív medicina fontosságát és számos kutatás zajlik már az őssejttranszplantáció lehetőségeiről. Azonban ahhoz, hogy az őssejttranszplantáció sikeres legyen, elengedhetetlen, hogy megismerjük a vándorló őssejtek viselkedésének molekuláris hátterét, a bélidegrendszer kialakítása során zajló jelátviteli folyamatokat és azok közötti kapcsolatokat, valamint azt a támogató mikrokörnyezetet, ahol a sejtek sikeresen vándorolnak, osztódnak és differenciálódnak.

## II. Irodalmi áttekintés

### 2.1 A bélidegrendszer általános felépítése

Az orvostudomány kezdetekben az emberi szervezet irányításáért felelős idegrendszeri struktúraként a központi idegrendszert és főleg az agyat emelte ki. Azonban a múlt századtól kezdődően különös figyelmet szenteltek a kutatók a bélidegrendszer feltérképezésére. Eredményeiknek köszönhetően egyre szélesebb körben kezd elfogadottá válni a bélidegrendszer „második agyként” való említése. Ezt kiválóan tükrözi Michael D. Gershon 1999-ben megjelent ismeretterjesztő könyve, ami a bélszatorna saját “agyáról” ír, amely utat nyitott a tudományos érdeklődésű olvasó számára is a bélrendszeri megbetegedések jobb megértése felé (1. ábra).

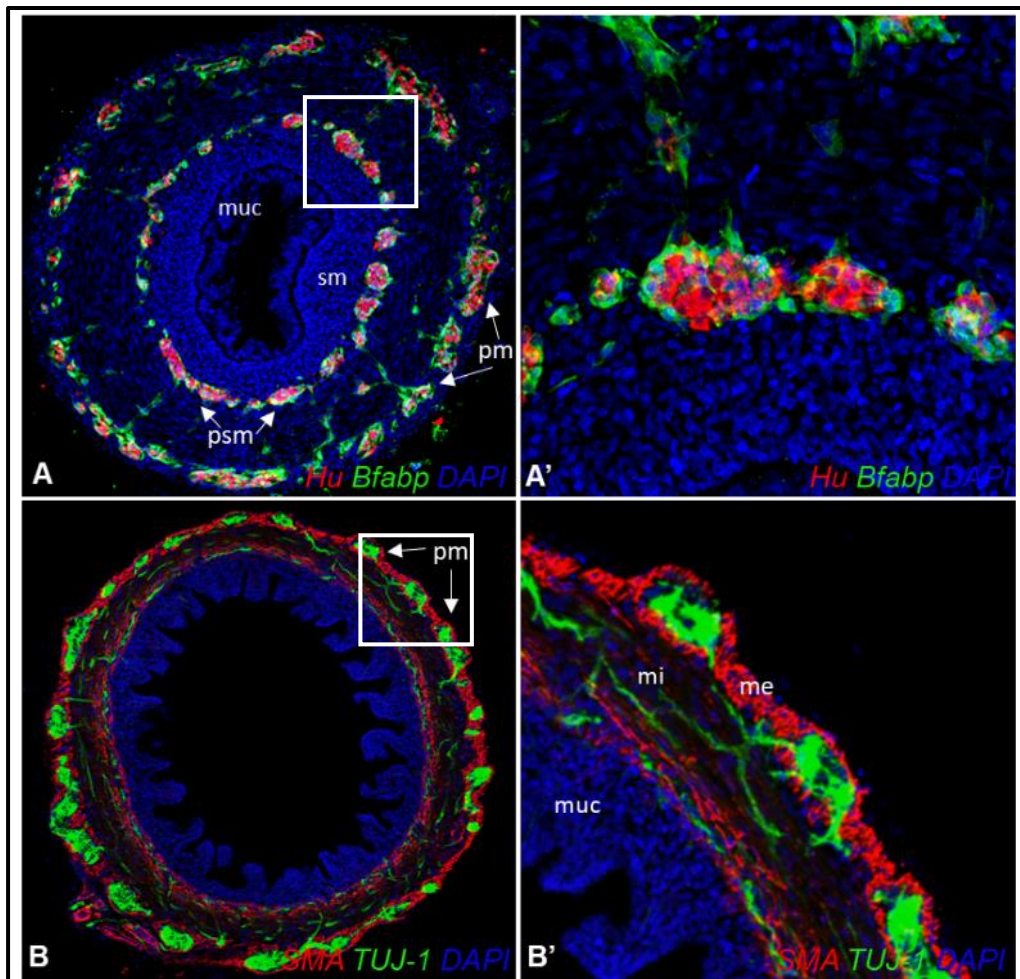


**1. ábra : Michael D. Gershon -The Second Brain:** A Groundbreaking New Understanding Of Nervous Disorders Of The Stomach And Intestine című könyv borítója (HarperCollins Publishers, NY, USA, 1999)

A bélidegrendszert, a paraszimpatikus és szimpatikus idegrendszer mellett, az autonóm idegrendszer harmadik képviselőjeként említik (Furness és Costa 1980). A bélidegrendszer emberben kb. 400-600 millió idegsejtből áll, amelyek hozzávetőlegesen 20 különböző funkcionális osztályba tartoznak (Furness 2006), így ez második, idegsejtet legnagyobb számban tartalmazó struktúra a testünkben (Schemann 2005). A bélidegrendszer tehát több idegsejtet tartalmaz, mint a vegetatív idegrendszer szimpatikus és paraszimpatikus hálózata összesen, valamint meghaladja a gerincvelői idegsejtjek számát is (Furness 2012). Mélyrehatóbb vizsgálatok saját, intrinszik idegi pályákat fedeztek fel, amelyek szenzoros primer afferens neuronokat, interneuronokat és különböző motoneuronokat (excitatorikus és inhibitorikus, szekretomotoros, vazomotoros) tartalmaznak (Furness 2006, Brookes 2001). Ezek a bélidegrendszerre jellemző idegpályák támasztják alá azt a régebbi megfigyelést, hogy a bélidegrendszer önmagában is képes a vékonybél motorikus funkcióit irányítani, még akkor is, ha az teljesen el volt különítve a központi idegrendszertől (Bayliss és mtsai. 1899). Az előbb felsorolt eredmények és megfigyelések teszik kellőképp megalapozottá a bélidegrendszer elkülönítését a központi és vegetatív idegrendszertől is, valamint ennek a szakirodalomban is “második agy”-ként való megnevezését.

A bélidegrendszer felelős a gasztrointesztinális traktus autonóm mozgásáért, motilitásáért (kialakítva annak perisztaltikus mozgásmintázatát), a gyomorsav szekréciójának szabályozásáért, a helyi véráramlás szabályozásáért, valamint kapcsolatot teremt a bél immun- és endokrinrendszerével (Furness 2012). A bélidegrendszer a gyomor és béltraktus falában található neuron és gliasejtekből álló ganglionok (enterális ganglionok, dúcok) és az ezeket összekötő idegrostok hálózata (Furness és Costa 1980). Az enterális ganglionok megtalálhatóak egészen a nyelőső simaizom rétegétől kezdődően a végbél záróizmáig (Furness és Costa 1980, Furness 2006). A neuronok részletes osztályozása több mint 20 funkcionális csoportba sorolható idegsejtet különít el (Furness 2000, Furness 2006), melyek nyulványai más neuronokkal szinaptizálnak, beidegzik az izomréteget, a szekretoros epithéliumot és vérereket is. A ganglionokban helyet foglaló neuronokat és az idegrostokat számos enterális gliasejt veszi körül. Ezeket a gliasejteket kezdetben periférikus Schwann-sejteknek hitték, de elektronmikroszkópos tanulmányok alapján ezek inkább hasonlítottak a központi idegrendszer asztrocitáihoz (Furness 2006).

A bélidegrendszer két fő fonatrendszerből (plexus) áll: *plexus myentericus* és *plexus submucosus* (2. ábra). A gasztrointesztinális traktus falában található, ganglionokban gazdag plexusokat először Meissner (1857), Billroth (1858) és Auerbach (1862) írták le (Furness 2006). A külső, *plexus myentericus* (Auerbach-féle fonat) a hosszanti- és a körkörös simaizomréteg között helyezkedik el, enterális ganglionokból és az ezeket összekötő idegrostokból áll. A bélidegrendszer idegsejtjeinek többsége a myentericus ganglionokban fordul elő, és ez a plexus felelős legfőképp a két izomréteg automatikus perisztaltikus mozgásáért. A *plexus submucosus* (Meissner-féle fonat) a bélfal nyálkahártya alatti rétegének kötőszövetében helyezkedik el. Ez a plexus szabályozza a nyálkahártya alatti réteg szekretoros és abszorpciós funkcióit. A *plexus submucosus* ganglionjai általánosságba véve kisebbek, mint a myentericus ganglionok, és az összekötő idegrostok is vékonyabbak, de ez a plexus is folytonos a vékonybél és vastagbél teljes hosszán (Furness és Costa 1980, Furness 2006).



**2. ábra: Az embrionális bélidegrendszer felépítése.** (A) 12 napos csirke embrió utóbél keresztmetszetén végzett kettős fluoreszcens festés az enterális plexusok ideg- és gliasejtjeit jelöli (Hu: neuron-specifikus-RNS kötő fehérje – piros; Bfabp: brain-fatty acid binding proteint expresszáló gliasejtek – zöld; DAPI: sejtmag festés – kék). (A') Az A képen bekeretezett ganglion nagyobb felbontású felvétele. (B) 16 napos embrió középbél keresztmetszetén végzett kettős fluoreszcens festés a két plexus idegsejtjeit, valamint a ganglionokat elhatároló simaizom rétegeket jeleníti meg (SMA: alfa-simaizom-aktin – piros; Tuj-1: béta-III-tubulin – zöld; DAPI sejtmag festés – kék). (B') A B kép bekeretezett részének nagyobb felbontású felvétele. A *plexus myentericus* (pm) a külső hosszanti (*muscularis externa* – me) és a belső körkörös (*muscularis interna* – mi) izomrétegek között helyezkedik el. A *plexus submucosus* (psm) a nyálkahártya (*mucosa* – muc) alatti rétegben (*submucosa* – sm) foglal helyet.

A bélidegrendszer annak ellenére, hogy nagyfokú automáciával rendelkezik, számos ponton kapcsolatban áll a központi idegrendszerrel, ami szerepet játszik a bélidegrendszer működésének finomszabályozásában. A bélidegrendszer enterális ganglionjain végződnek például vegetatív szimpatikus neuronok axonjai, kapcsolat fedezhető fel extrinzik (X. agyidegtől és hashártyából származó rostok) idegek és a *plexus myentericus* között is. Számos bélidegrendszeri és központi idegrendszeri neuron kapcsolódik belsőszervek szintjén, valamint

egy enterális neuronok axonjai a bélből kilépve a prevertebrális szimpatikus ganglionokhoz futnak, ahonnan az információ a központi idegrendszerbe kerül. Leírtak már olyan enterális ganglionokban jelenlevő idegsejteket is, amelyek az agytörzsbe, vagy a lumbo-sacralis gerincvelőbe vetülnek (Furness 2012, Furness és Stabbing 2017).

Annak ellenére, hogy a bélidegrendszert szöveti komplexitása és működése valamint nagyfokú függetlensége miatt “második agynak” nevezik, a bélidegrendszer és központi idegrendszer evolúcióját célzó kutatások arról számolnak be, hogy a bélidegrendszer kialakulása megelőzte a központi idegrendszer megjelenését. A két idegrendszer közötti kölcsönös kapcsolatok, valamint az evolúciós vizsgálatok adatai sokkal inkább két különálló de egymástól kölcsönösen függő idegrendszer együttes evolúcióját (koevolúció), mintsem a két idegrendszer közös leszármazásának jeleit mutatják. A bélidegrendszer neuronokból és gliasejtekből felépülő ganglionhálózata hasonló felépítést mutat a hidráktól (*Hydra*), tengeri uborkákon (*Holothuroidea*) és gyűrűsférgeken át (*Annelida*) a polipokon (*Octopoda*) keresztül egészen az emberig, és számos olyan fajban is jelen van, amelyek központi idegrendszerrel nem rendelkeznek, mint pl. tüskésbőrűek (*Echinodermata*) vagy félgerinchúrosok (*Hemichordata*) (Furness és Stabbing 2017). A különböző élőlény csoportokban a bélidegrendszer kialakulásának mechanizmusa eltérhet egymástól, vagy különböző gasztrointesztinális régiók között is különbség lehet. Kétéltűekben és hüllőkben a plexus submucosus kizárólag a nyelőcső és a gyomor területén található, zebrahalban ez teljesen hiányzik, egérben pedig csak posztnatálisan jelenik meg (Gunn 1951, Lamanna és mtsai. 1999, Wallace és Burns 2005). Azonban a különböző törzsek fajainak bélidegrendszere közötti nagyfokú neurokémiai hasonlóságok a bélidegrendszernek egy közös eredetére utalnak. A kutatások alapján a bélidegrendszer már azelőtt megjelent a törzsfejlődés során, hogy a csalánzóok és kétoldali szimmetriájú állatok (*Bilateria*) kettéváltak volna, viszont a központi idegrendszer a kétoldali szimmetriájú állatok (pl. gerincesek) jellemzője. Következésképp a bélidegrendszer a központi idegrendszer előtt, és ettől függetlenül alakult ki, mely az evolúció során megőrizte struktúráját (Furness és Stabbing 2017).



### 2.3 A béliidegrendszer embrionális fejlődése.

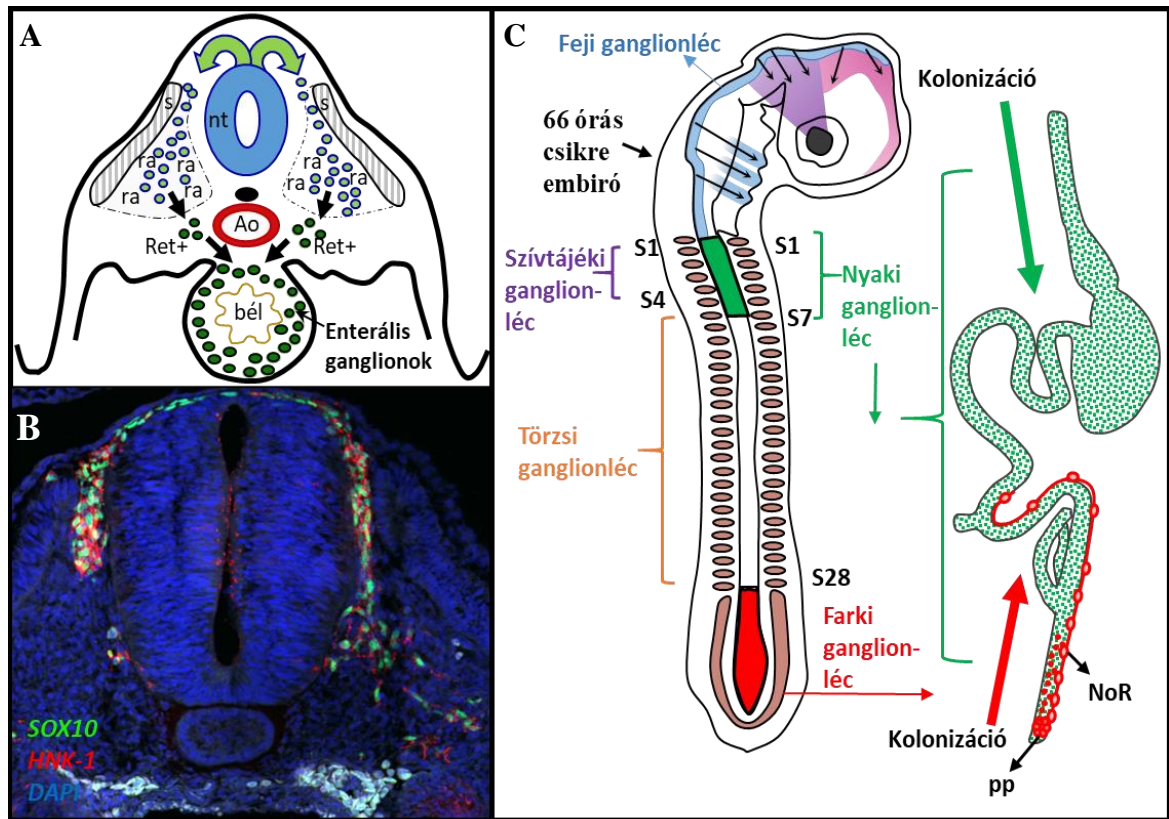
Gans és Northcutt szerint a gerincesek evolúciójának egyik fontos mérföldköve volt a ganglionléc (dúcél, *crista neuralis*, neural crest – NC) megjelenése, mivel ez vezetett később a gerincesek koponyájának kialakulásához (Gans és Northcutt 1983).

A ganglionléc egy átmeneti, multipotens összejtpopulációt tartalmazó struktúra, amely minden gerinces egyedfejlődésének korai szakaszában jelenik meg a kialakuló embrionális velőcső (neural tube) dorzális oldalán. A ganglionléc kialakulása az embriogenezis során az ektodermában a velőlemez (*lamina neuralis*) és a nem-neurális (epidermális) ektoderma határán veszi kezdetét. A velőlemez és a nem-neurális ektoderma közötti határfelület (neural plate border) a neuruláció folyamán a velőredők és a velőbarázda/velősánc létrejöttével felemelkedik, majd ezek záródásával a velőcső besüllyed. A ganglionléc prekursor sejtjei a már felemelkedő velőredőben jelen vannak, és a besüllyedéskor a velőcső dorzális felszínére kerülnek (Selleck és Bronner 1995). Epitheliális-mesenchymális tranzíciót (EMT) követően a ganglionléc őssejtek ezután leválnak a velőcsőről (delamináció) és intenzíven vándorolni kezdenek (3. ábra A, B képek) és az embrió szinte minden szervébe eljutnak. A különböző területekhez érkező ganglionlécsejtek a szöveti környezet hatására számos sejttypussá képesek differenciálódni : ideg- és gliasejtekké; csont-, porc- és kötőszöveti elemekké; endokrin sejtekké vagy melanocitákká (Le Douarin és Teillet 1973, Yntema és Hammond 1954, Bronner és Le Douarin 2012, Gilbert és Barresi 2016). A ganglionléc-őssejtek multipotenciája és differenciálódásuk széles spektruma miatt Brian K. Hall szerint a ganglionléc „negyedik csíralemeznek” tekinthető, és a három csíralemezes koncepció elavult nézet (Hall 1998).

A ganglionléc-eredetű sejtek sorsa különbözik attól függően, hogy a ganglionléc melyik régiójából származnak, ugyanis az embrió cranio-caudális tengelyén a ganglionlécnek négy szegmensét különítjük el : feji ganglionléc (cranial neural crest), nyaki ganglionléc (vagal neural crest), törzsi ganglionléc (trunk neural crest) és farki ganglionléc (sacral neural crest), valamint elkülönítjük a nyaki ganglionléc egy jól körülhatárolható alegységét melynek sejtjei a szív telepét népesítik be, ez a szívtájéki ganglionléc (cardiac neural crest) (Ayer-Le Lievre és LeDouarin 1982, Bronner és LeDouarin 2012, Gilbert és Barresi 2016). A feji ganglionléc az elő-, közép-, és utóagy szintjén található őssejteket foglalja magába. Az innen kivándorló ganglionlécsejtek hozzák létre az arc csontozatát, kötő- valamint támasztó szöveget, egyes agyidegek gliasejtjeit és érződúcaikat (3. ábra, C kép) (D'amico-Martel Martel és Noden 1983).

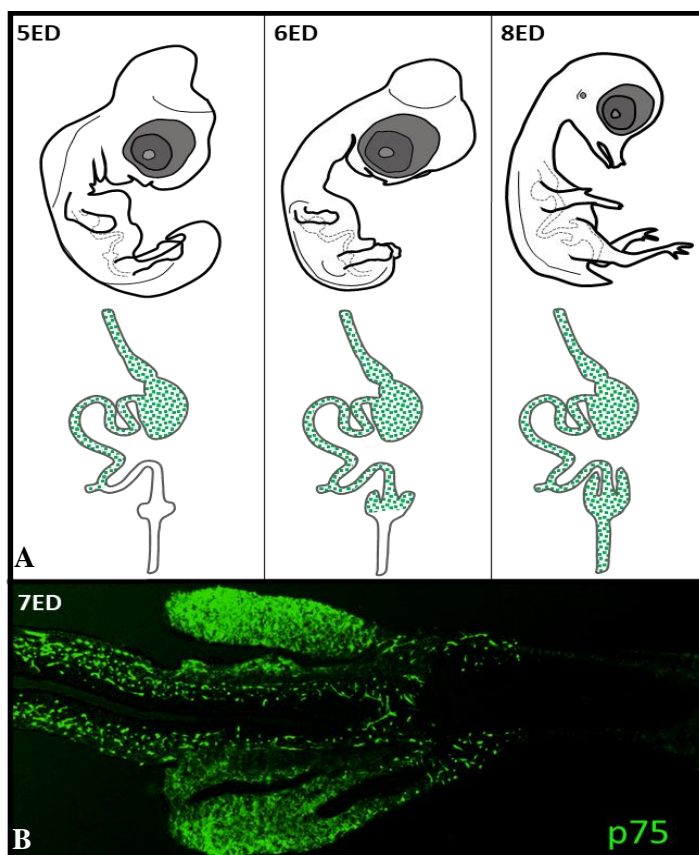
A nyaki ganglionléc (1-7 őscsigolyák szintje) összejtjei a nyelőcső szintjén lépnek be a tápcsatornába és kolonizálják azt, kialakítva a bélidegrendszert (3. ábra, C kép) (LeDouarin and Teillet, 1973). A törzsi régióból kivándorló sejtek hozzák létre a perifériás idegrendszer érző- és szimpatikus dúcait, Schwann sejteket, valamint a mellékvesevelő sejtjeit (Serbedzija és mtsai 1994). A farki régió (28. őscsigolyától caudálisabban) ganglionléc sejtjei a vastagbél disztális szakaszát és a kismedencei zsigerek vegetatív beidegzését alakítja ki, valamint az erről a tájékról származó enterális ganglionléc sejtek alakítják ki a Remak-gangliont és a *plexus pelcivus*-t is. Csirke embriókon végzett kísérletekkel tisztázták először, hogy bár a Remak-ganglion részt vesz a béltraktus rostok általi extrinszik beidegzéséhez, a *plexus pelvicus* az, ahonnan az enterális ganglionsejtek származnak (Nagy és mtsai. 2007) (3. ábra C kép).

A ganglionléc-eredetű sejteket először His írta le csirke embrióban, 1868-ban (Bronner és Costa 2016, His 1868). A bélidegrendszer és a ganglionléc fejlődéstani kapcsolatát Yntema és Hammond igazolta először szintén csirkeembirón végzett kísérleteikkel. Embriomanipulációs kísérleteik során eltávolították a nyaki régióra eső ganglionléc (vagal neural crest) területét, mely a bélidegrendszer teljes hiányához vezetett (Yntema és Hammond 1954). Később Nicole LeDourain 1973-ban a csirke-fürj kiméra kísérletek bevezetésével lehetővé tette a bélidegrendszer eredetének pontosabb meghatározását. Ezzel a módszerrel pontosan igazolni lehetett, hogy a bélidegrendszert létrehozó összejtjei a ganglionléc nyaki (vagal) és farki (sacral) szakaszából származnak (LeDourain 1973, Burns és mtsai, 2002, Nagy és mtsai. 2007) (3. ábra C kép , 4. ábra).



**3. ábra: A bélidegrendszer és a ganglionélfajldástani kapcsolata.** (A) A ganglionélc eredetű sejtek velőcsőről történő delaminációjának ábrázolása. A ganglionélc eredetű sejtek a velőcső (nt – neural tube) dorzális felszínéről leválnak, majd az őscsigolyák (s – somita) közt ventrálisán haladnak. Ebben a mezodermális környezetben a lokális retinsav (ra – retinic acid) hatására RET receptort expresszálnak (Ret+ sejtek), és elköteleződnek a bélidegrendszeri őssejtek irányába, majd az előbél felé fordulnak és az egész bélcsatornát kolonizálják, kialakítva a bélidegrendszert (Nagy és Goldstein 2017 után módosítva). (B) 66 órás csirke embrió keresztmetszetén SOX10 és HNK-1 dúlcéscsejt markerekkel végzett immunfluoreszcens jelöléssel megfigyelhető a ganglionélc sejtek delaminációja és ventrális irányú vándorlása. (C) A ganglionélc régiói, valamint az ebből származó ganglionélc-eredetű őssejtek kolonizációs útvonala. A bélidegrendszert kialakító enterális ganglionélc sejtek a ganglionélc nyaki és farki régiójából származnak. A nyaki régióból (1-7 őscsigolyák szintje) származó enterális ganglionélc sejtek caudális irányba haladva kolonizálják a tápcsatornát. A farki régióból (28. őscsigolyától caudálisan) származó sejtek pedig ezzel ellenkezőleg, rostralis irányba haladva alakítják ki a vastagbél mellett dorsálisan haladó, madarakra jellemző Remak-gangliont (Nerve of Remak – NoR), valamint a *plexus pelvicut* (pp) melyek hozzájárulnak az utóbél beidegzéséhez. (Gilbert és Baressi 2017, Goldstein és Nagy 2008 nyomán módosítva)

A nyaki régióból származó ganglionléc-eredetű őssejteket (neural crest cells; NCC) amint beléptek a nyelőcső mesenchymájába (embrionális kötőszövet) RET-receptort expresszáló enterális ganglionlécsejteknek nevezzük (enteric neural crest-derived cells; ENCC). Ezek az ENCC sejtek caudális irányba haladva kolonizálják a teljes gasztrointesztinális traktust, vándorlásuk során intenzíven osztódnak és differenciálódnak. A béltraktus kolonizációja során az élvonalban haladó, intenzíven migráló ENCC sejteket “wavefront” sejteknek nevezi a szakirodalom. Ezek a legelől haladó differenciálatlan sejtek fokozatosan kolonizálják a bélfal mesenchymáját. A mögöttük kb. 400 mikrométernyi távolságra található sejtek migrációja fokozatosan lecseng és elkezdnek neuron valamint glia irányba differenciálódni. Intenzív migrációjuknak köszönhetően a “wavefront” sejtek 4,5ED stádiumban (4,5. Embrionális nap, embryonic day) a középbelet, a köldöki részt 5ED, a vakbél telepét pedig 6ED stádiumban érik el. A 8ED embrionális stádium végére a teljes béltraktus kolonizációja megörténik (4. ábra). Humán embrióban a ganglionlécsejtek craniocaudális migrációja az 5. gesztációs héten kezdődik és a 12. hétre fejeződik be, míg ugyanez a folyamat egérben 5 napot vesz igénybe és a 9,5ED - 14,5ED embrionális korban zajlik le (Burns és LeDouarin 2002, Fu és mtsai. 2004, Goldstein és Nagy 2008, Nagy és Goldstein 2017).



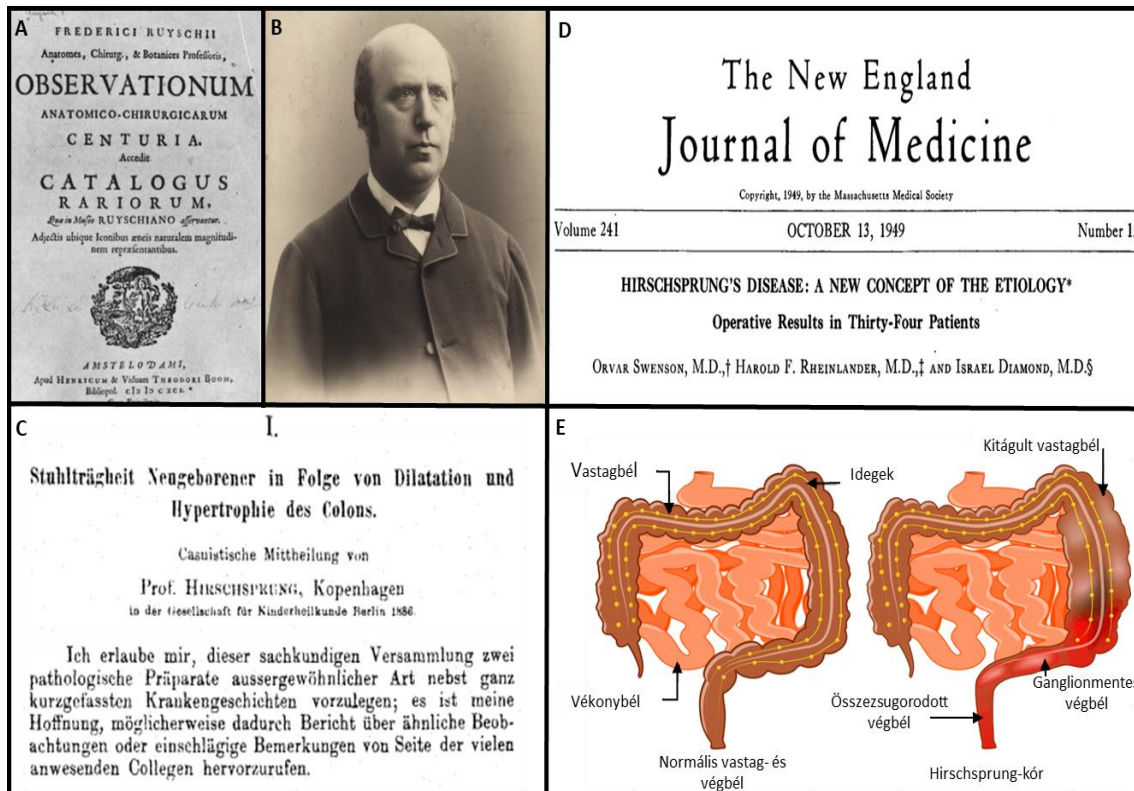
**4. ábra: A béltraktus kolonizációja csirke embrióban. (A)** A sémás rajz a béltraktus ganglionlécsejtes kolonizációját ábrázolja. A felső képsorban a különböző korú csirke embriók, alattuk a kolonizáció állapota (Goldstein és Nagy 2008 után módosítva). **(B)** Egy 7 napos embrionális bél p75 “wholemout” immunfluoreszcens technikával jelölt bélszakaszának hosszmetsete, bennük az utóbelet kolonizáló p75 neurothrophin- receptort expresszáló ENCC sejtek, amint épp elhagyták a vakbél szakaszt és elkezdték az utóbél proximális szakaszának kolonizációját.

Valamennyi gerinces esetén az NCC sejtek enterális irányba történő elköteleződése már a korai migrációjuk során eldől, ugyanis a delamináció után az őscsigolyák környezetében lokálisan termelődő retinsav ezekre a sejtekre hat (3 ábra, A kép). A retinsav az NCC sejtek RAR retinsav-receptoraihoz kötődve aktiválja a RET tirozin-kináz-receptor expresszióját, amely kulcsfontosságú fehérje az enterális őssejtek további migrációjában és a bélidegrendszer kialakulásában (2.4 fejezet). Az embrionális fejlődés során a vándorló őssejtpopuláció tagjai és a bélcsőben differenciálódó sejtek megfelelő molekuláris markerekkel nyomkövethetők. A velőcsőről levált NCC sejteket SOX10 és PHOX2B transzkripciós faktorok expressziója jellemzi, ezek mellett p75 neurotrophin-receptort expresszálnak felszínükön. Az enterális vonal felé elkötelező ENCC őssejtek jelölésére az EdnrB- és RET-receptorok alkalmasak, míg az intenzíven vándorló "wavefront" sejtek azonosítása a HNK-1, N-cadherin és L1CAM markerekkel lehetséges. A "wavefront" sejtpopuláció mögött a sejtek glia és neuron irányba kezdenek differenciálódni. A neuron irányba differenciálódó sejtek olyan korai neuron markereket fejeznek ki, mint a HuC/D neuronspecifikus RNS-kötő fehérje, béta-III-tubulin (Tuj-1) és CN (chick neurite marker), ugyanakkor ezek a sejtek elveszítik SOX10 expressziójukat. Ezzel ellentétben a glia irányba differenciálódó sejtek megőrzik SOX10 expressziójukat, majd a korai differenciálódás szakaszába lépve Bfap-t (brain fatty acid protein), később Gfap-t (glial fibrillary acid protein) expresszálnak (Young és Newgreen 2001, Nagy és mtsai. 2012, Nagy és mtsai. 2017).

#### **2.4 Hirschprung-kór és a bélidegrendszer rendellenes fejlődése**

1691-ben Fredericus Ruysch, holland anatómus egy fiatal kislány erős alhasi fájdalomáról és kórosan kitágult vastagbéléről tesz feljegyzést, munkája az *Observationum Anatomico-chirurgicarum Centuria*-ban jelent meg 1691-ben (5. ábra, A kép) (Leenders és Sieber 1970). Később egyre több hasonló esetről számoltak be, majd 1886-ban Harald Hirschprung dán gyermekgyógyász a jelenséget részletesebben leírta, emiatt később a betegséget róla nevezték el. A közlemény szerint két fiatal fiú halt meg hasi disztenzió (kóros puffadás), veleszületett megacolon és krónikus székrekedés következtében. A tanulmány 1888-ban jelent meg a "Gesellschaft für Kinderheilkunde-Berlin" c. folyóiratban "Constipation in the Newborn as a Result of Dilatation and Hypertrophy of the Colon" címmel (5. ábra, B kép). A számos korai megfigyelés ellenére a betegség etiológiája ismeretlen volt egészen 1949-ig. A bostoni Harvard

Egyetemen sebésze, Orvar Swenson ismerte fel először, hogy a Hirschsprung-kórt nem a rendellenesen kitágult vastagbél okozza, hanem a kitágult megacolon alatti bélszakasz születés előtti rendellenes aganglionotikus (ganglionmentes) fejlődése, melynek következtében az állandó kontrakcióban van és nem képes kitágulni, ami megmagyarázza az eddig leírt kórosan kitágult vastagbélszakaszt, székrekedést és az ürítésre való képtelenséget (5. ábra, C kép) (Swenson és mtsai. 1949, Kapur 2000, Holschneider és Puri 2008).



**5. ábra: A Hirschsprung-kór felfedezésének történeti áttekintése.** (A) F. Ruysch's 1691-ben megjelent könyvének első oldala, amelyben elsőként került leírásra a congenitális megacolon jelenség (Leenders és Sieber 1970). (B) Harald Hirschsprung portréja (Google). (C) H. Hirschsprung közleményének fejléce, melyben leírja a megacolon. (D) Orvar Swenson 1949-es publikációjának fejléce. Ő ismerte fel először, hogy a Hirschsprung-kór mögött a disztális colorectum idegrendszerének hiánya áll. A bélperisztaltika az érintett szegmens területén hiányzik, ennek eredménye, hogy itt folyamatos simaizom kontrakció és bélelzáródás lép fel, a béltartalom pedig a normálisan beidegzett proximális szakaszon pang és ennek következtében kitágul. Swenson végezte el először a ganglionmentes bélszakasz eltávolítását, aminek köszönhetően a beteg meggyógyult (Swenson és mtsai. 1949). (E) A betegség vázlatos ábrázolása: a disztális vastagbélszakasz, valamint a végbél területén a bélidegrendszer nem fejlődik ki, hiányoznak az enterális ganglionok. (TeachMePaediatrics nyomán módosítva)

A Hirschprung-kór (HSCR) jelenleg csak sebészi beavatkozással orvosolható és hosszútávon ez további komplikációkkal (bélgyulladás, motilitási zavar, szövetpusztulás) járhat. Az elmúlt években egyre több információ látott napvilágot a bélidegrendszer embrionális fejlődésével kapcsolatban, valamint azonosításra kerültek azok az őssejtek, amelyek ennek kialakításáért felelősek. A regeneratív medicina felismerte az őssejt-transzplantációban rejlő lehetőségeket, de a hatékony őssejt-terápia kifejlesztéséhez kiemelten fontos, hogy feltérképezzük a ganglionléc-eredetű őssejtek mikrokozonyezetét, feltárjuk molekuláris kapcsolataikat, és megértsük differenciálódásukat, migrációjukat, ploriferációjukat.

#### 2.4.1 A Hirschprung-kór kialakulásának molekuláris háttere

A gasztrointesztinális traktus ENCC sejtek általi benépesítése során, míg a frontvonalban haladó, intenzíven migráló "wavefront" sejtekek erősen proliferatívák és invazívák, addig a mögöttük levő szubpopuláció sejteinek migrációja lassan lecseng, és neuron vagy gliasejteké differenciálódva kialakítják a bélidegrendszert. Tehát, a három fontos folyamat (migráció, ploriferáció és differenciáció) egyidejű szinkronizálása és pontos koordinálása elengedhetetlen. Amennyiben az ezeket szabályozó molekuláris mechanizmusok sérülnek, a HSCR-ra jellemző neurointesztinális zavar alakulhat ki.

A bélidegrendszer fejlődésében az egyik legfontosabb jelátviteli út a RET-jelátvitel, amelynek pleiotrópikus hatása van a bélidegrendszer kifejlődésére. A RET egy tirozin-kináz-receptor, melynek ligandja a gyomor és bél mesenchymájában termelődő GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor). A GDNF elsősorban az ENCC sejtek migrációjáért felelős kemoattraktáns növekedési faktor, mely legelőször a gyomorban expresszálódik, és biztosítja az ENCC sejtek további vándorlását a középbél felé. Második expressziós helye a vakbél telepe, mely egy újabb stimuláló zónát jelent a vándorló ENCC sejtek számára, arra serkentve az áthaladó sejteket, hogy folytassák kolonizációjukat a disztális utóbélszakasz felé. *In vitro* kísérletekkel is igazolták, hogy kollagén gélbe oldott GDNF hatására a tenyészetbe kihelyezett embrionális bélszakaszokból a ganglionlécsejtek intenzív kivándorlása történik meg (Fu és mtsai. 2004, Nagy és Goldstein 2006). A GDNF-RET szignálút vonal esszenciális a ganglionléc sejtek túléléséhez, proliferációjához, migrációjához és differenciálódásához. A GDNF bekötődése számos olyan jelátviteli folyamatot indít el (mitogén aktivált protein kináz kaskád, IP3-út vonal), amelyek különösen fontosak a GDNF-indukált ENCC sejtek proliferációja, túlélése és migrációja szempontjából. A korábban említett retinsav jelenléte mellett, a SOX10 és PHOX2B transzkripciós faktorok expressziója is szükséges a RET expressziójához. Ezeknek a géneknek a mutációi a HSCR esetek több mint 50%-át okozzák (Pattyn és mtsai. 1999,

Gabriel és mtsai. 2002, Asai és mtsai 2006, Nagy és Goldstein 2008, Nagy és mtsai. 2012, Nagy és Goldstein 2017)

Egy másik kulcsfontosságú növekedési faktor az endothelin-3 (Et3) peptid, amely szintén a bél mesencymájában termelődik és az ENCC sejtek G-fehérjéhez kapcsolt endothelin-receptor-B (EdnrB) receptorához kötődik. Mutációjuk a colorectális bélszakasz aganglionózisához vezet (Mccallion és Chakravarti 2001). Nagy és Goldstein csikre embrión végzett kísérletei igazolták, hogy az endothelin-3 kezdetben a vakbél és majd az utóbél szintjén expresszálódik – 24 órával korábban- mielőtt az ENCC sejtek elérik ezt a bélszakaszt. Az Et3-EdnrB-jelátvitel gátlása aganglionózist eredményezett az utóbél szintjén. Csirke embrión végzett kísérleteik megerősítették az Et3-EdnrB jelátvitel egérben megfigyelt szerepét: az Et3 az ENCC sejtek differenciációjára is hat, hiszen a migrációt indukáló hatása mellett gátolja a prekursor sejtek neuron és glia irányú differenciálódását (amit a GDNF indukál), ezáltal biztosítva a folyamatosan vándorló és osztódó őssejtpopuláció elkötelezetlen sátuszát (Nagy és Goldstein 2006, Nagy és Goldstein 2008)

A mesenchymális eredetű növekedési faktorok és receptoraik által alkotott jelátviteli folyamatok mellett egyre több kutatás az embrionális bél mesenchymája által termelt extracelluláris mátrix (ECM) összetételét is vizsgálja. Az embrionális bél saját extracelluláris mátrixának összetételével képes befolyásolni a gasztrointesztinális traktus kolonizációját. Megkülönböztetünk migrációt elősegítő ECM molekulákat (pl. laminin, fibronektin, vitronektin, kollagén-1) és gátló hatású ECM molekulákat (pl. kollagén-6, tenaszcin, kondroitin-szulfát-proteoglikánok, CSPG: verszikán, kollagén-9) (Nagy és Goldstein 2017, Sasseli és mtsai. 2012, Nagy és mtsai 2009, Akbareian és mtsai. 2013). Több tanulmány szerint azokban a betegekben, ahol a bélidegrendszer fejlődése zavart szenvedett és a disztális vastagbélszakasz ganglionmentes (aganglionózis), ott az ECM összetétele is megváltozott (Parikh és mtsai. 1992, 1994, Fujiwara és mtsai. 2018, Gao és mtsai. 2020). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a gasztrointesztinális ECM hozzájárul a neurointesztinális rendellenességek kialakulásához.

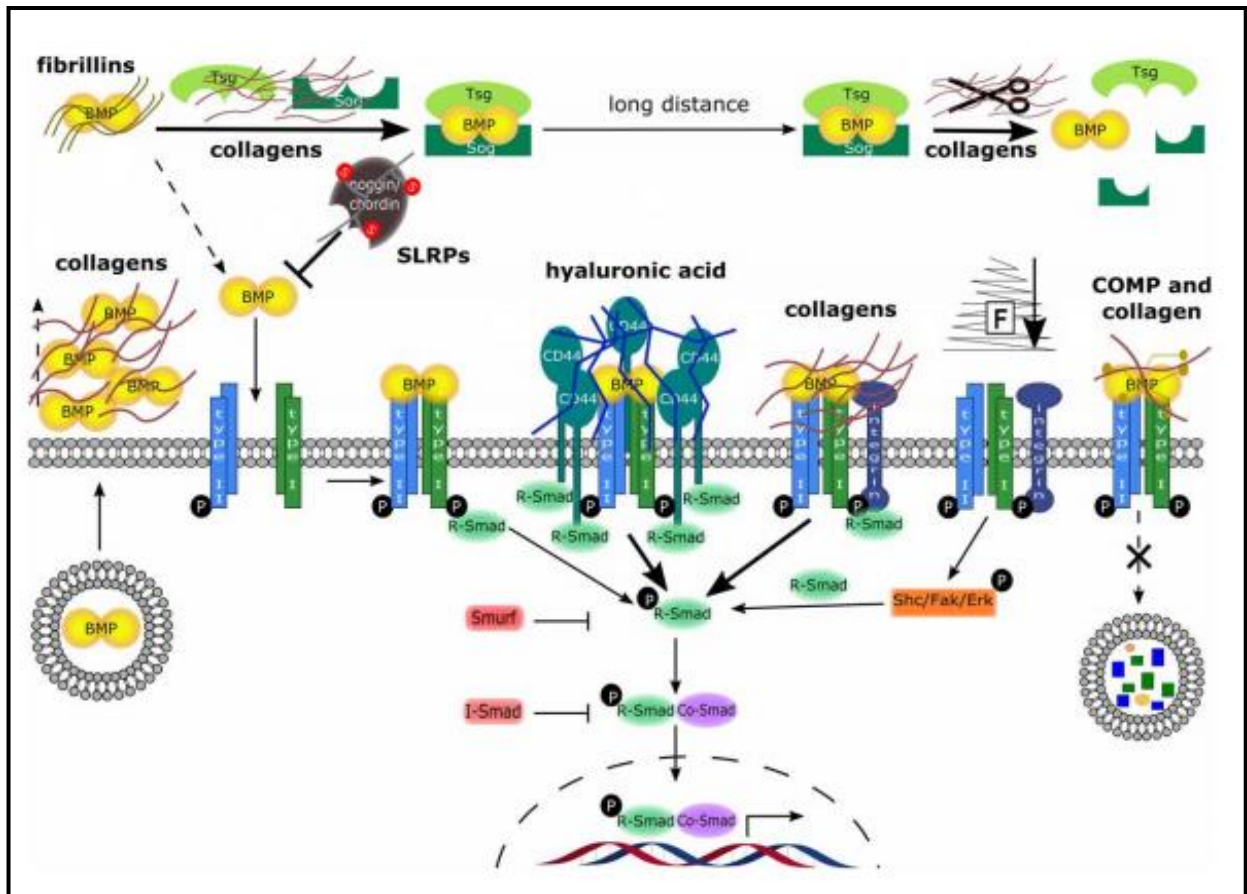


## 2.5 A BMP-jelátvitel szerepe a bélidegrendszer fejlődésében

A GDNF és Et3 mellett számos egyéb mesenchymális eredetű növekedési faktorról derült ki, hogy a bélcső fejlődésének szabályozásán túl a bélidegrendszer sejtjeire is hatnak. Ide sorolható a VEGF, CXCL12 és a BMP-4 növekedési faktorok, amelyek a bélfal ereinek és simaizom szövetének differenciálódásának szabályozása mellett a ganglionléc sejtek bélben történő fejlődését is irányítják. (Goldstein és mtsai. 2005, Nagy és mtsai. 2009, Ding 2013)

A BMP fehérjék a TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) növekedési faktorok szupercsaládjához tartoznak. A TGF- $\beta$  szupercsalád nagyszámú polipeptid faktorai számos celluláris folyamatot képesek irányítani, beleértve a proliferációt, differenciációt, migrációt, sej-sejt kapcsolatok kialakítását és az apoptózist is. A BMP család tagjainak szerepét legkorábban a csontfejlődésben írták le, innen kapták a BMP (bone morphogenetic proteins) nevet. Csontfejlődésben kiemelt szerepük azonban nem az egyetlen, részt vesznek a ganglionléc eredetű sejtek indukciójában és osztódásában, apoptózisában, migrációjában és differenciálódásában, így fontos elemei az embrionális fejlődésnek és mintázat-kialakulásnak (Kléber és mtsai. 2005, Obermayr 2013).

A BMP jelátvitel receptorai a plazmamembránban található szerin-threonin-kináz receptorok (TGF- $\beta$  receptor I és II). A BMP-4 a II-es típusú receptorhoz bekötődve térszerkeztbeni konformációváltozást okoz és hozzákapcsolódik az I-es típusú receptorhoz. A ligand bekötődése után a TGF- $\beta$  receptor II aktív szerin-threonin-kináz doménje foszforilálja a TGF- $\beta$  receptor I egyik szerin vagy threonin aminosavját, amelynek következtében ez aktiválódik. Az aktivált TGF- $\beta$  receptor I ezután citoszólikus Smad-1 és Smad-5 (R-Smad) fehérjéket fog foszforilációval aktiválni. Két foszforilált R-Smad heterotrimer fehérje komplexet alkot egy Smad-4 fehérjével (Co-Smad). Ez a SMAD heterotrimer fehérje komplex a sejtmagba jutva transzkripciós faktorként aktiválja a célgének átírását. A BMP-fehérjék főbb célgénjei az Id-gének (inhibitor of differentiation genes), amelyek az őssejtek multipotenciáját és proliferációját biztosítják (Miyazono és mtsai. 2005). Az Jmjd3-gén szabályozza az őssejtek neuron irányú differenciációját (Yin és mtsai. 2019), a Dpysl2-gén a dentritikus kapcsolatok kialakulásáért felel (Fei és mtsai. 2010). Már az 1990-es évek elején kimutatták a BMP-fehérjék bizonyos ECM molekulákhoz való kötődését, és azóta az előbb leírt jelátvitel sokkal komplexebbé vált, kiegészülve az ECM molekuláival, melyek modulálják a BMP-jelátvitelt. Az ECM komponensek megköthetik a szabadon diffundáló ligand molekulákat, de megköthetik ezek antagonistá fehérjéit is, hozzákapcsolódhatnak a jelátviteli út receptoraihoz és kofaktoraihoz is (6. ábra).



**6. ábra: A BMP jelátvitel ábrázolása.** Az extracelluláris mátrix molekulái (kollagének, lamininek), továbbá kondroitin-szulfát és heparán-szulfát proteoglikánjai (CSPG, HSPG) is képesek megkötni a BMP molekulákat. Emellett az ECM komponensek kapcsolódhatnak a BMP-receptorokhoz is, de akár az extracelluláris térben levő antagonista fehérjéket is képesek magukhoz kötni. (pl. **Noggin**, Chordin). Az extracelluláris mátrix befolyásolja a jelmolekulák és növekedési faktorok diffúzióját, ezek elérhetőségét a célsejtek számára, mobilizálják vagy megkötik azokat multimolekuláris állványokat képezve. (Sedlmeier és Sleeman 2017)

A BMP-jelátvitel szerepét a tápcsatorna organogenezisében és a bélidegrendszer kialakításában is felismerték. PCR technikával mutatták ki a BMP-fehérjék és receptoraik expresszióját a bél mesenchymájában, valamint a bélidegrendszer prekursorsejtjeiben. A BMP-jelátvitel a bél belső mesenchymális rétegében meggátolja a simaizom kifejlődését. A BMP-jelátvitel gátlása muskuláris hipertrofiát, és rendellenes bélidegrendszer fejlődést eredményezett. Az enterális ganglionléc-eredetű sejteken végzett *in vitro* kísérletek a glia irányú differenciáció serkentését írták le BMP-4 hatására (De Santa Barbara 2005, Chalazonits és mtsai. 2011). Feltételezhető, hogy a BMP-4 szint finomszabályozása biztosítja a megfelelő glia/neuron arányt a fejlődő bélidegrendszerben-ben. Továbbá enterális ganglionléc-eredetű sejtek aggregációját (gangliogenezis) figyelték meg BMP-fehérjék hatására; BMP-4 hiányában a ganglionképzés elmaradt. Csirke és egér embriókon végzett

kísérletek ellentmondásos eredményeket mutatnak: csirke embrióba injektált Noggin fehérje gátolta a BMP-4 mediált jelátvitelt, aminek hatására hypoganglionózis figyelhető meg. Ezzel szemben embrionális egér szervtenyészetekben a BMP-4 gátolta az enterális ganglionléc-eredetű sejtek migrációját a bélcsatornában és serkentette az idegek korai fasciculációját (rostösszecsapzódás) (Chalazonitis és mtsai. 2004,2011,2012; Goldstein és mtsai. 2005, Fu és mtsai 2006.). Feltételezik, hogy a BMP-4 nem csak közvetlen módon hat az ENCC sejtekre, hanem közvetett módon egy másik jelátviteli folyamat szabályozásán keresztül, vagy az extracelluláris mátrix megváltoztatása által járul hozzá a bélidegrendszerfejlődéshez (6. ábra).

### **III. Célkitűzések**

Embrionális kísérletekből kapott eredmények felvetik a lehetőséget, hogy a BMP-4 jelátvitel zavara hozzájárulhat a Hirschprung-kórra jellemző rendellenes bélidegrendszer fejlődéséhez.

Szakdolgozati munkám célkitűzése volt:

- 1) BMP-4 expresszió karakterizálása az utóbél fejlődése során csirke embrióban.**
- 2) A BMP-4 jelátvitel hatásának vizsgálata a vastagbél idegrendszerének fejlődésére.**

## IV. Anyagok és módszerek

### 4.1 Kísérleti állatok

A kísérleteim során SPF (*specific pathogen free*) csirkeembriókat (*Gallus gallus*, White Leghorn SPF, Ceva-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt., Magyarország) használtam modellszervezetként. A csirketojásokat a laboratórium keltetőgépeiben 38°C-os hőmérsékleten, 90%-os páratartalommal inkubáltam 6 napig. Az embrionális kort napokban fejezem ki (ED - embryonic day). A kísérleti célokra felhasznált állatok tartása és feldolgozása megfelelt az állatvédelmi törvényekben előírtaknak és a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának (MÁB) jóváhagyásával történt.

### 4.2 A szöveti minták feldolgozása

#### 4.2.1 Az embriók béltraktusának izolálása

Az inkubációs lejártával az embriót perforált Moria típusú kanállal kiemeltem a tojásból, majd foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS – NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oldata) teli Petri-csészébe helyeztem. Ezt követően Nikon típusú sztereomikroszkóp alatt, mikropreparációra alkalmas eszközökkel (mikroolló, embriómanipulációra alkalmas csipeszek, embriókanál – Fine Science Tools, USA) az embriót felnyitottam és a béltraktust izoláltam, majd kimetszettem a kísérletekhez szükséges bélszakaszt. Az izolált szervekből az immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatokra fagyasztott zselatinos blokkot készítettem, vagy szervtenyészetek *in vitro* tenyésztésre használtam fel.

#### 4.2.2 Zselatinos-szacharózos fagyasztott blokk készítése

A kipreparált szerveket a PBS tartalmú Petri-csészéből 4%-os paraformaldehidet (PFA – pH 7,4, Sigma) tartalmazó pennicillines üvegcsébe helyeztem, és szobahőmérsékleten 2 órán keresztül fixáltam, majd PBS mosás után, a szerveket 15%-os szacharóz (Reanal puriss, 07140-0-08-38) 0,1M-os foszfát puffer oldatában (PBS, pH=7,2) inkubáltam egy éjszakán át 4°C-on. 24 órával később a szacharóz oldatot lecseréltem zselatin-oldatra [az oldat PBS-ben oldott szacharózt (15%) és zselatint (7,5%, Sigma, G2500) tartalmazott] és a szerveket 1 órán át, 37 °C-on inkubáltam. Műanyag tálkákba egy réteg 37 °C-os zselatint pipettáztam ami 10 perc inkubálás után megszilárdult. Az inkubálás után a szerveket a megszilárdult zselatin rétegre helyeztem. 10 perc várakozás után az üvegcsében levő zselatint a szervekre töltöttem és befedtem őket. Az elkészített zselatin blokkokat 4°C-on hagytam, hogy megszilárduljanak, majd kocka formára vágtam. Megjelöltem a szervek elhelyezkedését, hogy a metszés során orientálni tudjam a szerveket, ezután a zselatin blokkokat feliratozott kartonpapírra helyeztem

és folyékony nitrogénben lehűtött,  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os izopentánba (2-metilbután, Sigma M32631) 30-60 másodpercig mártva lefagyasztottam. A fagyasztott blokkokat felhasználásig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.

### **4.3 Fagyasztott metszetek készítése**

A metszést Shandon gyártmányú kriótómmal  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végeztem. A  $12\text{ }\mu\text{m}$  vastag metszeteket poly-L-Lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezekre vettem fel, majd felhasználásig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.

### **4.4 Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia**

#### **4.4.1 Immunhisztokémia – Chloronaftolos immunfestés**

A fagyasztott metszeteket először 10 percig  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os PBS-ben rehidráltam, amely idő alatt a zselatin kioldódott. Az ellenanyagot 1%-os BSA-t (Bovine Serum Albumin, Sigma A9647) és 0,1%-os Na-azidot tartalmazó PBS-ben (PBS-BSA) hígítottam ki. Ezután a primer ellenanyagot (I. táblázat) mikropipettával rámértem a metszetekre ( $40\text{--}60\text{ }\mu\text{l}$ /metszet), majd a tárgylemezeket 45 percig szobahőmérsékleten nedves kamrában inkubáltam. Az inkubálás után  $3\times 5$  perces PBS mosás következett. A primer ellenanyagokra jellemző izotípusú (IgG, IgM) és állatfajú (anti-egér, anti-szamar stb.) biotinilált szekunder ellenanyagokat (II. táblázat) használat előtt PBS-BSA-ban hígítottam (1:200), majd rámértem a metszetekre, amit 45 perc további inkubálás követett szobahőmérsékleten, nedveskamrában. Az inkubálási idő után újabb  $3\times 5$  perc PBS mosás következett, majd ezután blokkoltam a szöveti endogén peroxidázok aktivitását. A blokkolás 10 percig történt PBS 0,02X-es 30%-os  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma Aldrich, H1009) oldatában. A peroxidáz blokkolás után a metszeteket újból  $3\times 5$  percig mostam PBS-ben, majd rájuk mértem az előzetesen összeállított ABC-komplexet (avidin-biotin-peroxidáz komplex, Vectastatin Elite PK-6100, Vector Laboratories). A komplexet a gyártó által megadott hígításban állítottam össze, 1:100 arányban kimértem PBS-be az avidint (A), majd 1:100 arányban a biotinilált peroxidázt (B), a keveréket vortex segítségével alaposan összekevertem majd 30 percet állni hagytam szobahőn. A blokkolás és mosás után ezt az ABC komplexet rámértem a metszetekre, majd 30 perces inkubálás következett szobahőmérsékleten. Ez idő alatt előkészítettem az ellenanyag-ABC komplexhez kötődő peroxidáz enzim aktivitását kimutató 4-chloro-1-naftol (Sigma, C8890) oldatot: 50 ml PBS-hez  $50\text{ }\mu\text{l}$  4-chloro-1-naftol törzsoldatot adtam, majd ezt sötétben, alufóliával lefedett főzőpohárban, mágneses keverőn elegyítettem 30 percen át. Az oldatot szűrőpapíron átszűrtem, majd  $250\text{ }\mu\text{l}$  3%-os  $\text{H}_2\text{O}_2$ -t adtam hozzá, és a metszeteket  $3\times 5$  perces PBS mosás után ebben az oldatban inkubáltam 30 percig sötétben. Az előhívás lilás-kékesszürke színreakciót eredményezett. Ezután, a  $3\times 5$  perces PBS mosást

követően a metszeteket vízdékony metszetlefedő-anyaggal (Poly-Aqua Polyscience Inc., Warrington PA,USA; 18606) lefedtem, majd a tárgylemezeket 4°C-on tároltam.

#### 4.4.2 Immunfluoreszcencia

##### 4.4.2.1 Egyszeres immunfluoreszcens festés

A metszeteket rehidráltam (4.4.1 fejezet), illetve rájuk mértem a primer ellenanyagot (I.táblázat) (40-60 µl/metszet), melyet 1 órán át inkubáltam. Az inkubálás utáni 3x5 perces PBS mosást követően fluorokrómmal jelölt, a primer ellenanyagot felismerő szekunder ellenanyagot (III. táblázat) mértem rá a metszetekre, melyet PBS-ben hígítottam 1:100 vagy 1:200-as hígításban (fluoreszcens immunfestésnél a szekunder ellenanyagot nem hígítjuk PBS-BSA-ban, mivel a Na-azid gyengíti a fluoreszcenciát). A következő lépéseket a fluorokróm fényérzékenysége miatt fénytől védett helyen végeztem. 45 perces inkubálás után ismételt 3x5 perces PBS mosás következett. A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride, Invitrogen, D1306) reagenst használtam, PBS-ben hígítva, 1µg/ml arányban. Ezt 10 percig hagytam a metszeteken, a 10 perc inkubálás után 3x5 perces PBS mosás után, majd lefedtem.

##### 4.4.2.2 Kettős immunfluoreszcens festés

Rehidrálás után a metszetekre rámértem az első primer ellenanyagot a már ismertetett módon, és 1 órán át inkubáltam a tárgylemezeket. 3x5 perc PBS mosást követően a metszetekre pipettáztam a hígított, megfelelő izotípusú, fluorokrómmal jelölt szekunder ellenanyagot, és 45 percet inkubáltam. A következő lépéseket fénytől védett helyen végeztem. Ismételt PBS mosás után rátettem a második primert a metszetekre és 1 órán át tartó inkubálás következett nedves kamrában. Az inkubálást követő PBS mosás után a metszetekre rámértem a megfelelő specifikus, és az előzőleg használt szekunder fluorokróm színétől eltérő fluorokrómmal ellátott szekunder ellenanyagot, melyet újabb 45 perces inkubálás követett. 3x5 perces PBS mosást követően rámértem a metszetekre a sejtmagjelölő DAPI-t, 10 percig inkubálva hagytam a metszeteken, amit 3x5 perces PBS mosás és lefedés követett.

##### 4.4.2.3 Teljes szervi "Whole-mount" immunfestés

A teljes szervi immunfestéshez az embrionális béltraktus középbélből végbélig tartó szakaszát használtam fel. A szerveket 4%-os PFA-ban fixáltam 2 órán át rázatógépen (80 rpm), szobahőmérsékleten. 3x10 perces PBS mosás után a béldarabokat 0,1%-os Triton-X-es PBS-ben (elősegíti az ellenanyagok könnyebb hozzáférését és kötődését az antigénekhez) egy éjszakán át 4°C-on inkubáltam. 24 órával később primer ellenanyagot (p75 neurotrophin-

receptor [p75], Promega, G3231) hígítottam 1:1000 hígításban 0,1%-os Triton-X-PBS-BSA-ban, majd a mintákra 250 µl primert pipettáztam, és ezeket 1 órán át rázatógépen inkubáltam. Az inkubálást követően 3x10 percig mostam a mintákat PBS-ben, majd a szekunder ellenanyagot (kecske anti-nyúl IgG(H+L) Alexa-488, A21206) mértem a mintákra, és ezeket 1 órán át szobahőn, fénytől védve inkubáltam rázatógépen. 1 óra elteltével 3x10 perces PBS mosás következett, és az eljárás után a mintát immunhisztokémiailag feldolgoztam (4.2 fejezet) és az eredményről képeket készítettem fluoreszcens sztereomikroszkóppal (NikonSMZ 25)

**I. táblázat.** Az immunfestések során felhasznált primer ellenanyagok listája (klón neve, immunizált állatfaj (host species), ellenanyag specifitása, felismert struktúra, hígítás, beszerzés forrása)

Ellenanyag (klón)	immunizált állatfaj	Antigén specifitás	Megjelölt struktúrák	Hígítás	Forrás (katalógus szám)
Tuj1 (AA10)	egér	IgG2a	Beta-III típusú tubulin	1:100	Santa Cruz (sc-80016)
p75	nyúl (poliklonális)	IgG(H+L)	Enterális ganglionlécsejt	1:500	Promega (G3231)
Bfabp	nyúl (poliklonális)	IgG (H+L)	Korai gliasejtek	1:20	Dr.Thomas Müller
SMA (1A4)	egér	IgG2a	$\alpha$ -simaizom-aktin	1:200	Dako (M0851)
Hu (16A11)	egér	IgG2b	Neuronspecifikus-RNS kötő fehérje	1:20	Invitrogen (A-21271)
CSPG (9BA12)	egér	IgM	Kondroitin-szulfát proteoglikánok	1:1000	DSHB
Fibronectin(B3/D6)	egér	IgG2a	Fibronectin	1:5	DSHB
Tenaszcin (M1-B4)	egér	IgG1	Tenaszcin	1:5	DSHB
Kollagén-3 (3B2)	egér	IgG1	Kollagén-3	1:10	DSHB
Kollagen-6 (39-s)	egér	IgG1	Kollagén-6	1:10	DSHB
Kollagén-4 (M3F7)	egér	IgG1	Kollagén-4	1:2	DSHB

**II. táblázat:** Az immunfestés során felhasznált ellenanyagok (biotinilált szekunder ellenanyag neve faj és izotípus specifitása , beszerzés forrása és katalógus száma), 1:200 hígítás PBS-BSA-ban.

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

**III. táblázat:** Fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyagok (Invitrogen-Life Technologies, Merck). (Szekunder ellenanyag neve, faj és izotípus specifitása, a fluorokróm gerjesztési hullámhossza, beszerzés forrása és katalógus száma)

Szekunder ellenanyag	Gerjesztési hullámhossz	Beszerzési forrás	Katalógusszám
Számárban termelt anti-egér IgG(H+L)	594	Invitrogen-Life Technologies	A21203
Kecskében termelt anti-egér IgG1	488	Invitrogen-Life Technologies	A21121
Kecskében termelt anti-egér IgM	594	Invitrogen-Life Technologies	A21044
Kecskében termelt anti-egér IgG2a	488	Invitrogen-Life Technologies	A21131
Kecskében termelt anti-nyúl IgG(H+L)	488	Invitrogen-Life Technologies	A21206

## 4.5 Embriómanipuláció

### 4.5.1 Függesztett embrionális szervtenyészetek

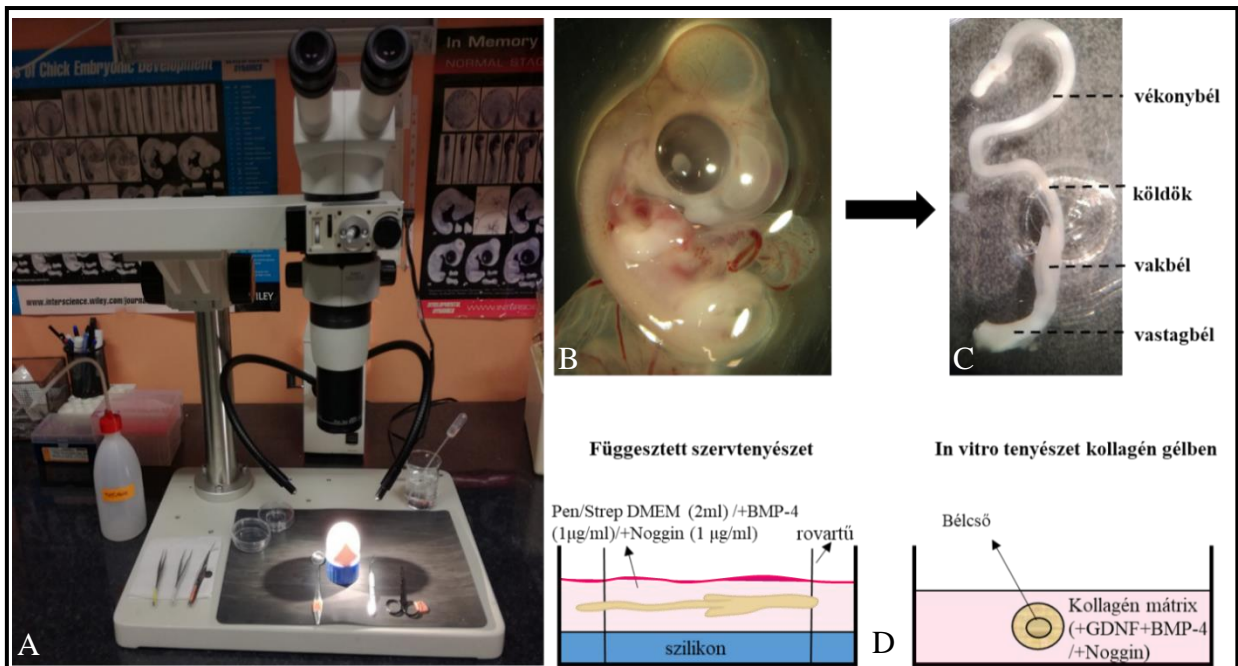
A szervtenyészetek készítéséhez minden esetben penicillin-sterptomycint [PenStrep, Sigma P0781] tartalmazó PBS-t (továbbiakban PenStrep PBS) és hat napos embriók béltraktusának középbél-kloáka szakaszát használtam, melyet steril körülmények között kipreparáltam. A kísérletekhez, szilikonnal bevont, alkohollal fertőtlenített, desztillált vízzel átmosott majd autoklávban sterilizált Petri-csészéket használtam. A kísérlet 3 tenyészetet foglalt magába, mindegyik tenyészetet 72 óráig tartott. A tenyésztés végén a bélszakaszokat



zselatinba ágyaztam és fagyasztott blokkokat készítettem belőlük a 4.2 fejezetben leírtak alapján. Három típusú tenyészet készült: egy kontroll, nem kezelt tenyészet (továbbiakban 6ED+3), egy BMP-4 kezelt (továbbiakban 6ED+3 BMP-4) és egy Noggin-kezelt (továbbiakban 6ED+3 Noggin) tenyészet. Az embrionális szervek izolálása után a szilikonnal bevont Petri-csészékbe 37°C-os PenStrep PBS-t töltöttem, majd az embrionális beleket rovartűvel (Fine Science Tools, USA, 26002-10) rögzítettem a középbél és a kloáka végénél. A rögzítés során nagyon vékony rovartűket használtam, és gondosan figyeltem arra, hogy a függesztés során a szervek ne tapadjanak a szilikon aljzathoz, hanem a körülöttük levő folyadékban “lebegjenek”. Ezeket a folyamatokat sztereomikroszkóp alatt végeztem erre alkalmas mikrosebészeti eszközökkel. A kontroll tenyészet esetén a függesztés után a Petri-csészéből eltávolítottam a PenStrep PBS-t, majd a tenyészethez 3ml, PenStrepet tartalmazó, vízfürdőben felmelegített DMEM tenyésztőmédiúmot (Dulbecco’s Modified Eagle Medium – high glucose, Sigma, D6429-500ml, RNBJ0386), adtam és 72 órára az 5%-os és 37°C-os CO<sub>2</sub> termosztátba helyeztem. A 6ED+3 BMP-4 tenyészet esetén a PenStrep-DMEM médiumba BMP-4 rekombináns fehérjét [R&D Systems, rm BMP-4, 10µg, recombinant mouse (CHO-derived) >95% purity, 5050BP] oldottam (1µg/ml). A 6ED+ 3 Noggin tenyészet esetén Noggin-rekombináns fehérjét [R&D Systems, rm Noggin (aa28-232), 25µg, recombinant mouse (NSO-derived) >95% purity, 6997-WG] oldottam a tenyésztő médiumba (2µg/ml) (7. ábra). 72 óra elteltével mindhárom tenyészet bélszakaszait PFA-val 1 órán át fixáltam, majd fagyasztott zselatin-blokkokat készítettem, végül lemetszettem a blokkokat és immunhisztokémiai módszerekkel folytattam a feldolgozást a 4.2, 4.3 és 4.3 fejezetekben leírt protokollok alapján.

#### 4.5.2 Kollagén-mátrix tenyészet

A kollagén-mátrix tenyészet alkalmas módszer az ENS prekursor sejtek migrációjának vizsgálatára, a BMP-4 jelátvitel indukálása és blokkolása esetén. 6 napos embriók béltraktusának középbél-vakbél szakaszát izoláltam, és kollagén-1 alapú mátrixba ágyaztam 48 órára. A tenyésztést erre alkalmas tenyésztőedényekben végeztem (Falcon 353037 Center-Well Organ Culture Dish). A tenyésztőedény közepébe a kollagénmátrixot, míg a külső részbe PenStrep-PBS oldatot öntöttem. Az embrionális bélszakaszokat a kollagén mátrixá két rétege közé ágyaztuk és 48 órát inkubáltam sejtenyésztő inkubátorban (37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett) (7. ábra).



**7. ábra:** Az embriomanipulációs kísérletek elvégzésének lépései. (A) munkaterület, (B) 6 napos csirke embrió. (C) Az embrióból izolált béltraktus. (D) A tenyészetek sematikus ábrázolása.

#### 4.5.2.1 A kollagén-mátrix elkészítése

1ml kollagén-mátrix elkészítéséhez egy 15 ml-es centrifugacsőbe mértem 700µl DMEM steril sejtenyészítő tápoldatot, és 294µl kollagén-1-t (Collagen type I rat tail, BD biosciences, 4236; 3,4mg/ml) mértem. A kollagén hozzáadásával az oldat elsárgul a pH megváltozása miatt, majd 6µl 1N NaOH oldatot mértem az 1mg/ml koncentrációjú kollagén oldathoz, hogy visszállítsam a neutrális pH-t és feloldjam a kollagént. A kollagén oldatból 350µl-t mértem a tenyésztőedény közepébe, majd 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után 10 percre 37°C-os termosztátba helyeztem, hogy a kollagén polimerizálódjon. 10 perc után az sejtenyészítő edényt kivettem az inkubátorból és az izolált embrionális szervszakaszokat ráhelyeztem a gél felszínére. Miután a szerveget ráhelyeztem a géltre, 5 perc szobahőmérsékleten való tárolást követően újra 10 percre 37°C-ra helyeztem a sejtenyészítő edényt. Az inkubálást követően a gélből újabb 350 µl kollagén oldatot pipettáztam rá a szervdarabkákra, hogy befedjem azokat, ügyelve arra, hogy ne ússzanak fel és 48 óráig tenyésztettem a termosztátban. A kísérlet tenyészetei a következő növekedési faktorokat tartalmazták: 1) GDNF-kontroll tenyészet: +1 µl GDNF (10ng/ml); 2) BMP-4 tenyészet: +1 µl GDNF +1 µl BMP-4 (1 µg/ml végkoncentráció) ; 3) Noggin tenyészet: +1 µl GDNF + 2 µl Noggin (1µg/ml végkoncentráció).

#### 4.5.3 Sejttenyészet fibronektinnel bevont felszínen

A BMP-4 közvetlen hatásának *in-vitro* vizsgálatára fibronektinnel bevont felszínen tenyésztettem a bélszakaszokat. Steril műanyag Petri-csészékbe 3ml fibronektin oldatot pipettáztam, 30 percre 37°C-os termosztátba raktam, majd az oldatot eltávolítottam, és a Petri-csészéket kiszárítottam, végül a fibronektinnel kezelt felszínen mikrocshipesszel apró karcolatokat ejtettem. A Petri-csészéket 37°C-os PenStrep PBS-el feltöltöttem, majd 5 darab vakbelet a karcolatokba helyeztem (elősegíti a szervek felszínhez való letapadását). Három típusú tenyészet készült: egy kontroll (növekedési faktort nem tartalmazó DMEM tápoldat), egy BMP-4 és egy Noggin kezelt. Első lépésben PenStrep-DMEM médiumban oldott GDNF-növekedési faktort tartalmazó oldatot (10ng/ml) adtam a szervekhez, majd 20 órára a tenyészeteket a termosztátba helyeztem (37°C, és 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett). Az inkubálási idő után a kontroll tenyészetet érintetlenül hagytam, a BMP-4 kezelt tenyészet esetén a GDNF-et tartalmazó tápoldatot 37°C-os PenStrep-DMEM-el háromszor kimostam, és 3ml PenStrep-DMEM sejttenyésztő médiumban 100 ng/ml koncentrációban feloldott BMP-4 rekombináns fehérjét adtam a tenyészethez. A Noggin-kezelt tenyészet esetén 3ml 200ng/ml-es végkoncentrációjú Noggint tartalmazó PenStrep-DMEM médiumot kaptak a sejtek. Mindhárom tenyészet visszakerült a termosztátba további 20 órára. Az inkubálási idő lejártá után a sejttenyészeteket PFA-ban fixáltam, majd kettős immunfluoreszcens festést végeztem el.

#### 4.6 *In situ* hibridizáció

Az RNS *in situ* hibridizációja a génexpresszió szöveti szintű kimutatására alkalmas módszer. Az *in situ* hibridizációt már felhasználásra alkalmas, paraffinba ágyazott különböző korú (5ED, 6ED, 7ED, 8ED, 14 ED) embriók utóbél keresztmetszetein végeztem. A laboratóriumban egy már beállított protokoll alapján a mintákat módosított Carnoy-fixáló eleggyel (etanol 60%, chloroform 30%, ecetsav 10%) fixáltuk, leszálló etanolsorban dehidráltuk és Paraplast Plus-ba ágyaztuk (Sigma, P3683), majd 7 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Deparaffinálás után a metszeteket 10 percig 37°C-on Proteináz-K-val emésztettük (1 µg/ml, Roche, 3115887) majd PBT-ben (0,1% Tween 20-at [MP Biomedicals 9005-64-5] tartalmazó PBS-ben) mostuk és 4%-os PFA-val utófixáltuk. A hibridizáció 70°C-on történt egy éjszakán át dioxigeninnel konjugált riboprobe-ot tartalmazó hibridizációs elegy segítségével [50% formamid (Fisher BP-2227-500), 5X SSC (Invitrogen AM9763), 50 µg/mL élesztő RNS (Sigma R6625), 1%SDS, 50 µg/mL heparin (Sigma H4784), pH=4,5). 24 óra után a metszeteket 2 órán át 10%-os birka szérummal (Jackson ImmunoResearch Lab.) blokkoltuk szobahőmérsékleten, amely után a metszeteket egy éjszakán át inkubáltuk anti-digoxigenin ellenanyagot (Sigma,11093274910) tartalmazó birka szérum és levamisole-PBT elegyben. [A

levamisole (tetramisole hydrochloride, Sigma, L9765) alkalikus foszfatáz gátló, ugyanis az *in situ* hibridizációs rendszerünk alkalikus foszfatáz enzim működésén alapszik, emiatt kell az endogén alkalikus foszfatázokat]. Az előhívást BM-Purple-el (Sigma, 11442074001) végeztük 24 órán keresztül, szobahőmérsékleten.

Az előhívást követően kettős fluoreszcens immunfestést végeztem el (4.4.2.2 fejezet) p75 és SMA markereket jelölő ellenanyagokkal (I. táblázat) és a megfelelő specifitású szekunder ellenanyagokkal (II. táblázat).

#### **4.7 Metszetek értékelése, képkészítés, képfeldolgozás, dokumentáció**

Az immunfluoreszcens képeket fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon E800), illetve konfokális mikroszkóppal (Zeiss LSM 710) készítettük. A képek feldolgozása és szerkesztése ImageJ és Adobe Photoshop CS 7.01 szoftverekkel történt. A fénymikroszkópos és fluoreszcens sztereomikroszkópos (Nikon SMZ 25) felvételeket Nikon Eclipse E800-as mikroszkóphoz csatlakoztatott Olympus DP74-es kamerával, CellSens szoftver segítségével készítettük.

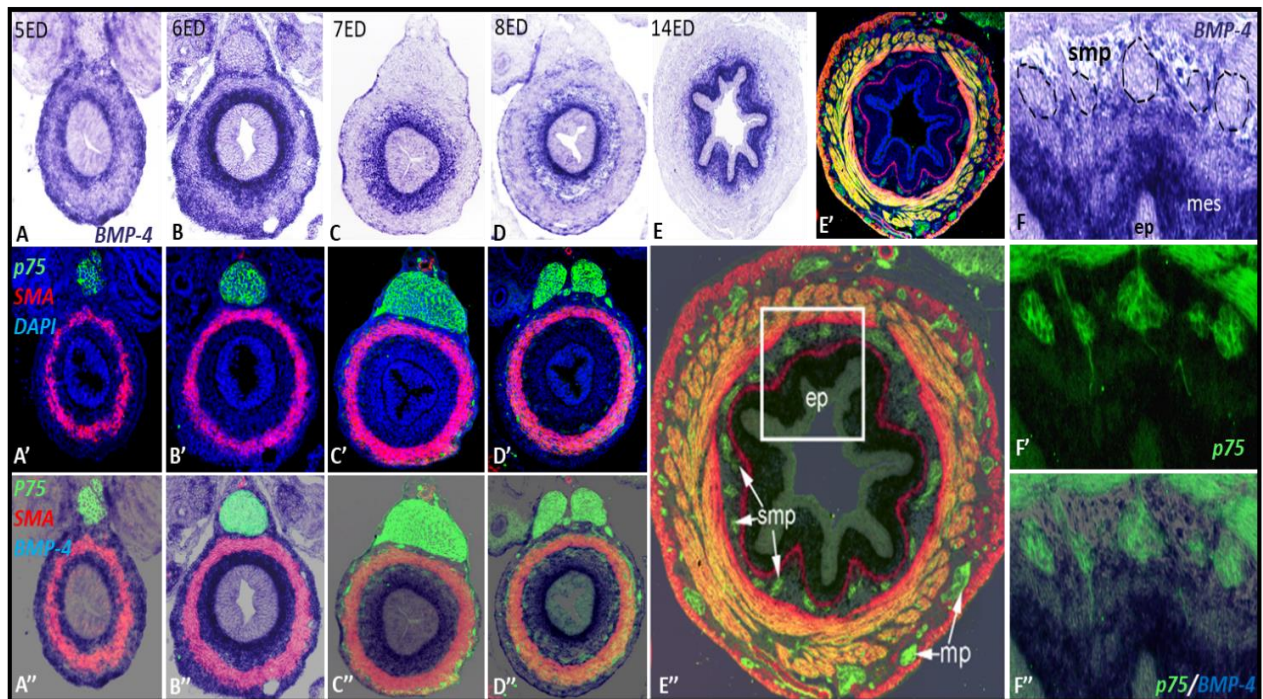
## V. Eredmények és kiértékelésük

### 5.1 A BMP-4 expressziós mintázatának vizsgálata az utóbél fejlődése során

Munkám első célja az volt, hogy *in situ* hibridizációva karakterizáljam a BMP-4 expresszióját a csirke utóbél embrionális fejlődése során. Ehhez első lépésben a már rendelkezésemre álló különböző korú (5ED, 6ED, 7ED, 8ED, 14ED) csirke embriókból izolált utóbelek paraffinos keresztmetszeteit használtam fel. Az *in situ* hibridizációs kísérlet során egy előre megtervezett RNS probe-ot (egyszálú RNS) használtam, amely hozzákötődött a BMP-4-et kódoló mRNS-hez, így szöveti szinten lehetővé vált a BMP-4 gén expressziójának lokalizációja. Az *in situ* hibridizáció után a metszeteken kettős immunfluoreszcens festéssel alfa-simaizom-aktinra (SMA) és p75 neurotrophin receptorra specifikus ellenanyagokkal jelöltem meg a bél simaizomszövetét és a ganglionléc sejteket (8. ábra). Korábbi BMP-4 expressziót vizsgáló kutatások nem mutattak ki BMP-4 expressziót azelőtt, hogy az utóbél ganglionléc sejtek általi kolonizációja megkezdődött volna. Goldstein és mtsai. csirke embrióban végzett kísérletei csak a 8. naptól mutatnak BMP-4 expressziót az utóbélben (Goldstein és mtsai. 2005). Roberts és mtsai. bár megemlíti a BMP-4 korai expresszióját az utóbélben, de gyenge jelre hivatkozva nem sikerült egyértelműen láttatni (Roberts és mtsai. 1995). Egér embriókban végzett kísérletek a BMP-4 expresszió legkorábbi megjelenését az utóbélben az embrionális fejlődés 10,5 napjára teszik (Fu 2006). *In situ* hibridizációs eredményeim alapján BMP-4 expresszió először az 5. embrionális napon figyelhető meg és kiemelten a háms alatti mesenchymára korlátozódik (8. ábra, A). A 6. embrionális naptól a belső mesenchymális réteg intenzív BMP-4 expressziót mutatott (8. ábra, B-E kép). A BMP-4-et expresszáló mesenchymát kívül az SMA+ simaizomréteg veszi körül (8. ábra, A'-E' kép). A bélfal két rétegében megfigyelhető mintázat szerint azon a területen, ahol BMP-4 expresszió hiányzik, ott simaizom réteg alakul ki (8. ábra, A''-E'').

A BMP-4 expresszió és a simaizom koncentrikus mintázata nem véletlen, ugyanis a simaizom differenciációt és az epitheliális-mesenchymális kölcsönhatásokat célzó kutatások tisztázták a molekuláris összefüggést. A BMP-4 expressziót a mesenchymában az epithelium által termelt Shh (Sonic hedgehog) indukálja (Sukegawa 2000, Nagy és mtsai. 2016). A mesenchymális BMP-4 expresszió meggátolja a mesenchyma simaizom szövevé váló differenciálódását, ezáltal mintegy kijelöli a simaizomréteg differenciációjának helyét és meghatározza a bél radiális szimmetriájának kialakítását. Továbbá, a Shh-jelátvitel gátlása esetén megfigyelhető a mesenchyma korai simaizom differenciációja, és a bél rendellenes radiális szimmetriájának kifejlődése (Sukegawa és mtsai. 2000, Nagy és mtsai. 2016).

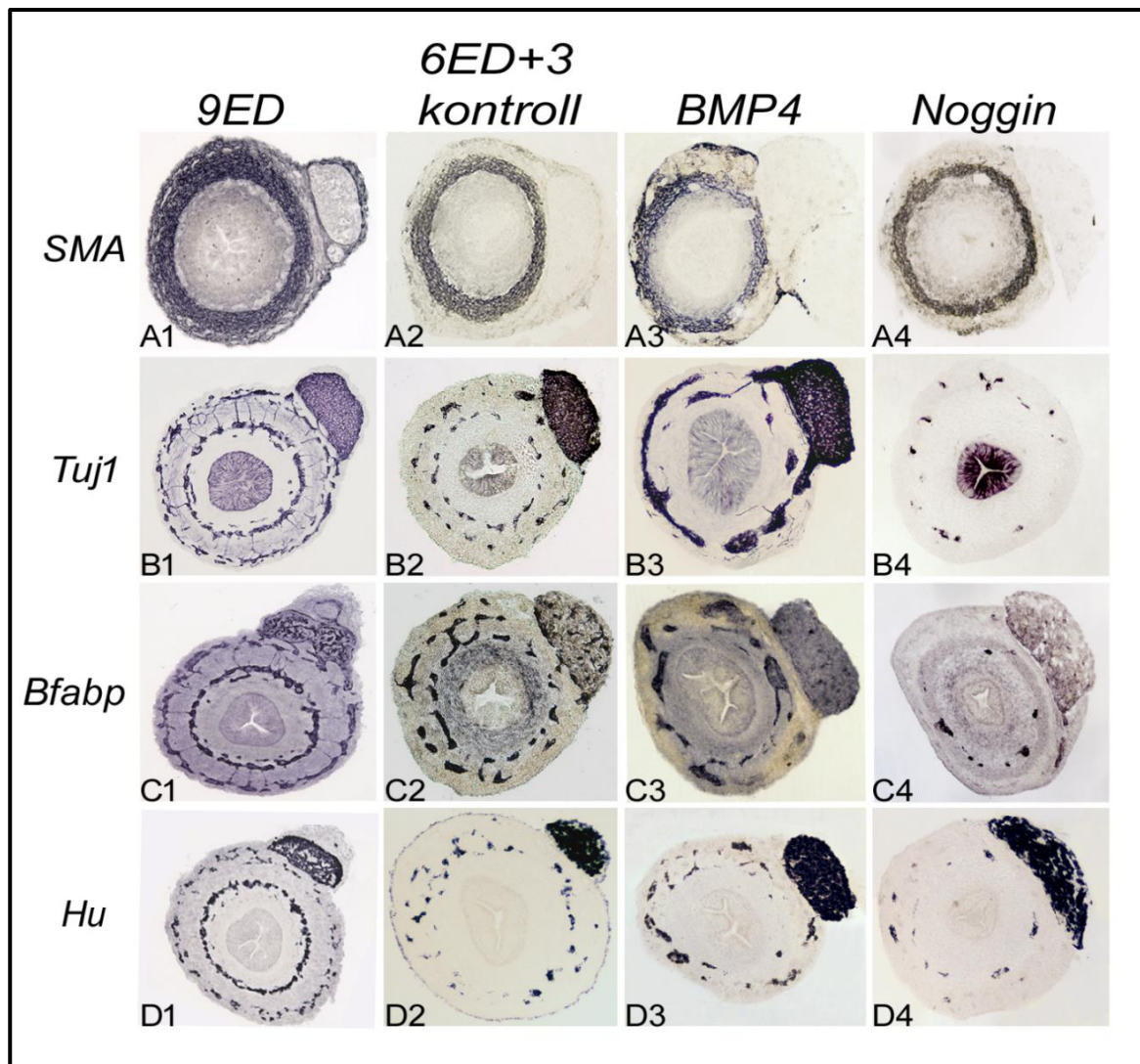
14 napos csirke utóbél keresztmetszetén megvizsgáltam, hogy a bélidegrendszert alkotó enterális ganglionok rendelkeznek-e BMP-4 expresszióval. Goldstein és mtsai. BMP-4 expressziót mutattak ki az enterális ganglionok és a Remak szintjén (Goldstein és mtsai. 2005), azonban saját kísérleteimben az *in situ* hibridizáció p75 immunokémiai jelölése két, egymással átfedést nem mutató sejtpopulációt jelölt. A BMP-4 az epithélium és a lamina muscularis mucosae között található mesenchymában expresszálódik, alacsonyabb intenzitással a submucosalis mesenchymában is megfigyelhető, de a p75+ enterális ganglionokat nem jelöli (8. ábra, F-F'' kép).



**8. ábra: BMP-4 expressziós mintázata a fejlődő utóbélben.** (A-E) A fejlődő utóbélben a BMP-4 expresszió (kékeslila színreakció) a belső mesenchymális rétegre korlátozódik. (A'-E') Az *in situ* hibridizáció után a keresztmetszeteken kettős immunfluoreszcens fetsés jelöli a ganglionléc-eredetű sejteket (p75 neurotrophin receptor – zöld) és simaizom szövetet (SMA  $\alpha$ -simaizom-aktin - piros). Az SMA+ simaizom réteg kölső körkörös rétegeket képez a BMP-4-et expresszáló mesenchyma körül. (A''-E'') Az A-E és A'-E' képek Photoshop programmal készített illesztése. A simaizom réteg és a BMP-4-et expresszáló mesenchyma teljesen elkülönül, kolokalizáció nincs. (E''). 14 napos embrió utóbél keresztmetszetén jól felismerhetőek az enterális plexusok ganglionjai (smp - submucosus plexus és mp – myentericus plexus, ep – epithélium). (F-F'') az E'' kép bekeretezett régiójának nagyobb felbontású felvétele. A plexus submucosus (smp) ganglionjai (F, körberajzolt terület) nem mutatnak BMP-4 expressziót. A p75 ganglionlécsejt marker és a mesenchymális (mes) BMP-4 expresszió nem kolokalizál (F'-F'').

## 5.2 A BMP-4 jelátvitel bélidegrendszer fejlődésére kifejtett hatásának vizsgálata *ex vivo* szervtenyészeteken

A BMP-4 jelátvitel expressziójának korai megjelenése, a bélszövetben megfigyelhető expressziója felveti a jelátvitel fontosságát a bélidegrendszer fejlődésében. Szakdolgozati munkám során kíváncsi voltam, hogy a BMP-4 jelátvitel milyen hatással van a bélidegrendszer embrionális fejlődésére. Ennek megválaszolására első lépésben szervtenyészeteket (Nagy és mtsai. 2020) készítettem csirke embriók béltraktusát felhasználva (4.5.1 fejezet). A kísérlet során 6ED csirke embriók béltraktusát izoláltam majd ezeket DMEM tenyésztőoldatot tartalmazó szilikonnal bevont steril Petri-csészékbe vékony rovartűkkel a disztális és proximális végeinél kifüggesztettem, végül BMP-4 és Noggin rekombináns fehérjéket tartalmazó tenyésztő odatban 72 órán át inkubáltam. A bélidegrendszer fejlődését chloronaftolos immunhisztokémia segítségével vizsgáltam, olyan specifikus ellenanyagokat használva, amelyek alkalmasak a bélidegrendszer idegi és glia populációinak jelölésére (9. ábra). Az SMA+ simaizomszövet a különböző kezelések során nem változott. (9. ábra, A1-A4 kép). BMP-4 kezelés hatására három nap tenyésztés után a bél falban abnormálisan nagy, ektópikus helyzetű idegsejt aggregátumok (9. ábra, B3, C3, D3 kép), valamint hipertrofizált rostok (fasciculáció) figyelhetők meg. (9. ábra, B3 kép). Ezzel szemben a Noggin kezelés hatására a bél disztális szakaszán a bél ganglionlécejtekkel történő kolonizációja zavart szenvedett, csak elszórtan találtam pár differenciált neuront (9. ábra, B4, D4 kép) és gliasejtet (9. ábra, C4 kép) illetve csak kisméretű ganglionok alakultak ki. (aganglionózis). Eredményeim megerősítik Goldstein és mtsai. csirke embrióban végzett kísérleteinek eredményeit (Goldstein és mtsai. 2005). A BMP-4 jelátvitel zavara meggátolta a ganglionlécejtek vándorlását. Emlős embriókon végzett *in vitro* kísérletek azonban ellentétes eredményt mutatnak, ugyanis egér esetében a disztális bélszakasz kolonizációjának zavara BMP-4 kezelés esetén volt észlelhető (Fu és mtsai 2006). A BMP-4 kezelés esetén tapasztalt, mások által még le nem írt ektópikus helyzetű és abnormális méretű ganglionok (hiperganglionózis), valamint az intenzív fasciculáció (rostösszezapződés) a Hirschprung-kórral gyakran együttjáró neurális diszplázia kórképére emlékeztet. Neurális diszplázia esetén is ektópikusan elhelyezkedő abnormális méretű ganglionokat és hipertrofikus rostokat írtak le (Schmittenebecher és mtsai. 1999). A Noggin kezelés esetén tapasztalt aganglionotikus fenotípus, a humán Hirschprung-kór fenotípusára hasonlít.

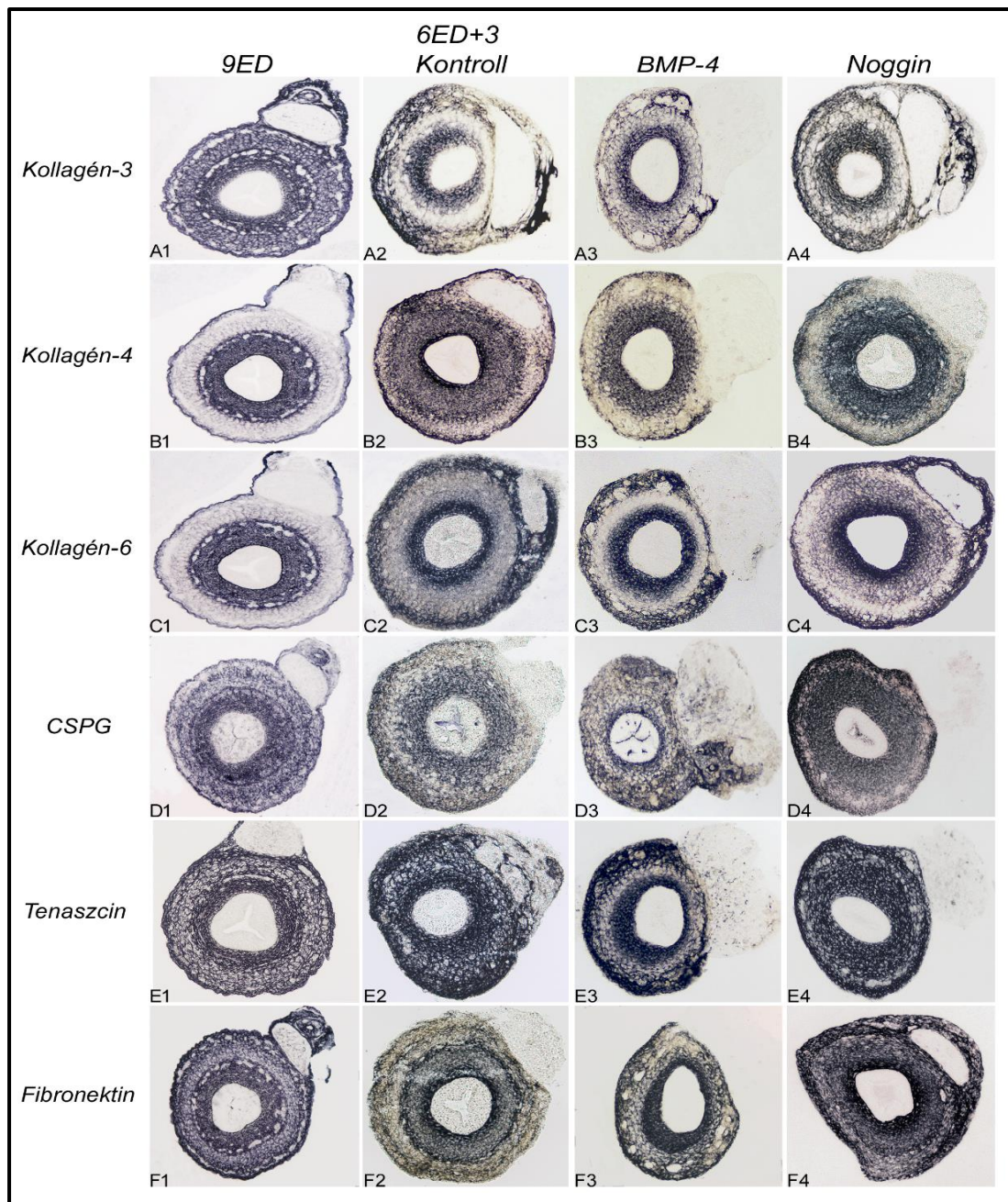


**9.ábra: BMP-4 jelátvitel hatása a bélidegrendszer fejlődésére.** *Ex vivo* szervtenyészetek BMP-4, Noggin kezelt és kontroll mintákon végzett chlornaftolos immunhisztokémia eredményei. **(A1-D1)** 9ED kontroll utóbél keresztmetszetek. **(A2-B2)** 6ED+3 kontroll tenyészet bélszakaszainak utóbél keresztmetszete. **(A3-B3)** 6ED+3 BMP-4 kezelt tenyészet bélszakaszainak utóbél keresztmetszete. **(A4-D4)** 6ED+3 Noggin kezelt tenyészet bélszakaszainak utóbél keresztmetszete. **(A1-A4)** SMA:  $\alpha$ -simaizom-aktin marker, a bél simaizom rétege. **(B1-B4)** Tuj-1: béta-III-tubulin a neuronok és idegrostok kimutatására alkalmas marker. **(C1-4)** Bfabp: brainy-fatty-acid-binding-protein marker a korai gliasejteket jelöli. **(D1-D4)** Hu- neuronspecifikus RNS kötő fehérje a korai neuronok kimutatására alkalmas marker.



### **5.3 A BMP-4 jelátvitel hatása a fejlődő utóbél extracelulláris mátrix expressziós mintázatára**

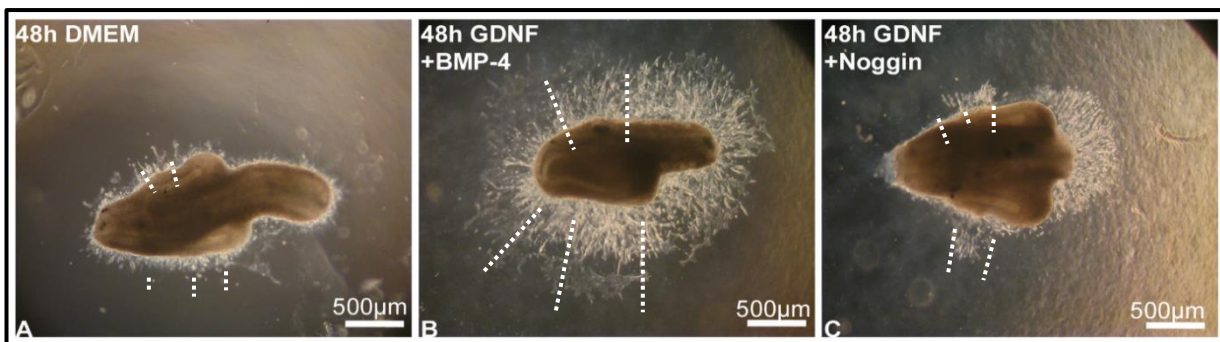
A függesztett szervtenyésztés során az ECM morfológiájában történő változásokat is vizsgáltam. Ez azért volt fontos, mert a BMP-4 jelátvitelhez szervesen kapcsolódik az extracelulláris mátrix is (2.5 fejezet, 6. ábra), valamint Hirschprung-kóros betegek esetében megváltozott ECM összetételt írtak le az érintett bélszakaszon (2.4.1 fejezet). Továbbá ismerünk olyan jelátviteli utakat, amelyek nem közvetlenül a vándorló és kolonizációt végző ENCC sejtekre hatnak, hanem a mesenchymális mikrokörnyezetet megváltoztatva befolyásolják a bélidegrendszer fejlődését. Egyik ilyen jelátvitel a Sonic Hedgehog (Shh) jelátviteli út, amely indukálja a BMP-4 jelátvitelt (Nagy és mtsai. 2016). A kísérlet során olyan ECM molekulák mintázatát vizsgáltam chloronaftolos immunhisztokémiával (10. ábra), amelyekről korábbi in vitro vizsgálatok igazolták, hogy befolyásolják a ganglionléc-eredetű sejtek migrációját: kollagén-3, -4, -6, fibronektin, tenaszcin, és CSPG. Azon kollagén molekulák mintázata amelyek korábbi tanulmányok szerint HSCR-kór ganglionmentes bélszakaszán megváltoztak (Gao és mtsai. 2020), a saját eredményeim alapján nem mutatnak jelentős elváltozást egyik kezelés hatására sem (10. ábra, A1-C4 kép). Továbbá nem találtam morfológiai eltérést a kezelések hatására a migrációt elősegítő fibronektin esetén sem (10. ábra, F1-F4 kép). Ezzel ellentétben, a CSPG és tenaszcin jelentős expressziós változást mutatott. Míg kontroll tenyészetben a CSPG és tenaszcin expressziója intenzíven a belső mesenchymális rétegre (leendő submucosalis réteg) korlátozódik (10. ábra, D1-D2, E1-E2 kép), addig a BMP-4 jelátvitel blokkoló Noggin kezelés esetén ez egészen a külső mesenchymális rétegre is kiterjed (10. ábra, D4, E4 kép). BMP-4 kezelés hatására a CSPG-ok jelenléte a közvetlenül epitélium melletti vékony belső mesenchymára korlátozódik (10. ábra, D3 kép). A CSPG-okról kimutatták, hogy gátolják a ganglionléc-eredetű sejtek migrációját (Dutt és mtsai. 2006, Nagy és mtsai. 2016), azonban a tenaszcin ganglionléc-eredetű sejtek migrációjára való hatásáról ellentétes eredmények vannak. Egér embriókon végzett kísérletekben a tenaszcin gátló ECM molekulaként viselkedett (Breau és mtsai. 2009), csirke embriókkal végzett kísérletek esetében a tenaszcin migrációt serkentő molekulaként definiálják (Akbareian 2013). A tenaszcin kiterjedt jelenlétét is kimutatták már HSCR betegek aganglionotikus bélszakaszában (Parikh és mtsai. 1992, 1994).



**10. ábra:** Az extracelluláris mátrix változása a BMP-4 és Noggin kezelés hatására. *Ex-vivo* szervtenyészetek BMP-4 és Noggin kezelt, valamint kontroll mintáin végzett cholonaftolos immunhisztokémia eredményei: (A1-F1) 9ED kontroll utóbél keresztmetszetei. (A2-F2) 6ED+3 kontroll tenyészet bélszakaszainak utóbél keresztmetszetei. (A3-F3) 6ED+3 BMP-4 kezelt tenyészet bélszakaszainak utóbél keresztmetszete. (A4-F4) 6ED+3Noggin kezelt tenyészet bélszakaszainak utóbél keresztmetszete. (A1-A4) Kollagén-3. (B1-B4) Kollagén-4. (C1-C4) Kollagén-6. (D1-D4) Kondroitin-szulfát-proteoglikánok (CSPG). (E1-E4) Tenaszcin. (F1-F4) Fibronektin.

#### 5.4 A BMP-4 jelátvitel hatása az ENCC sejtek migrációjára 3D kollagén-gél tenyészetekben

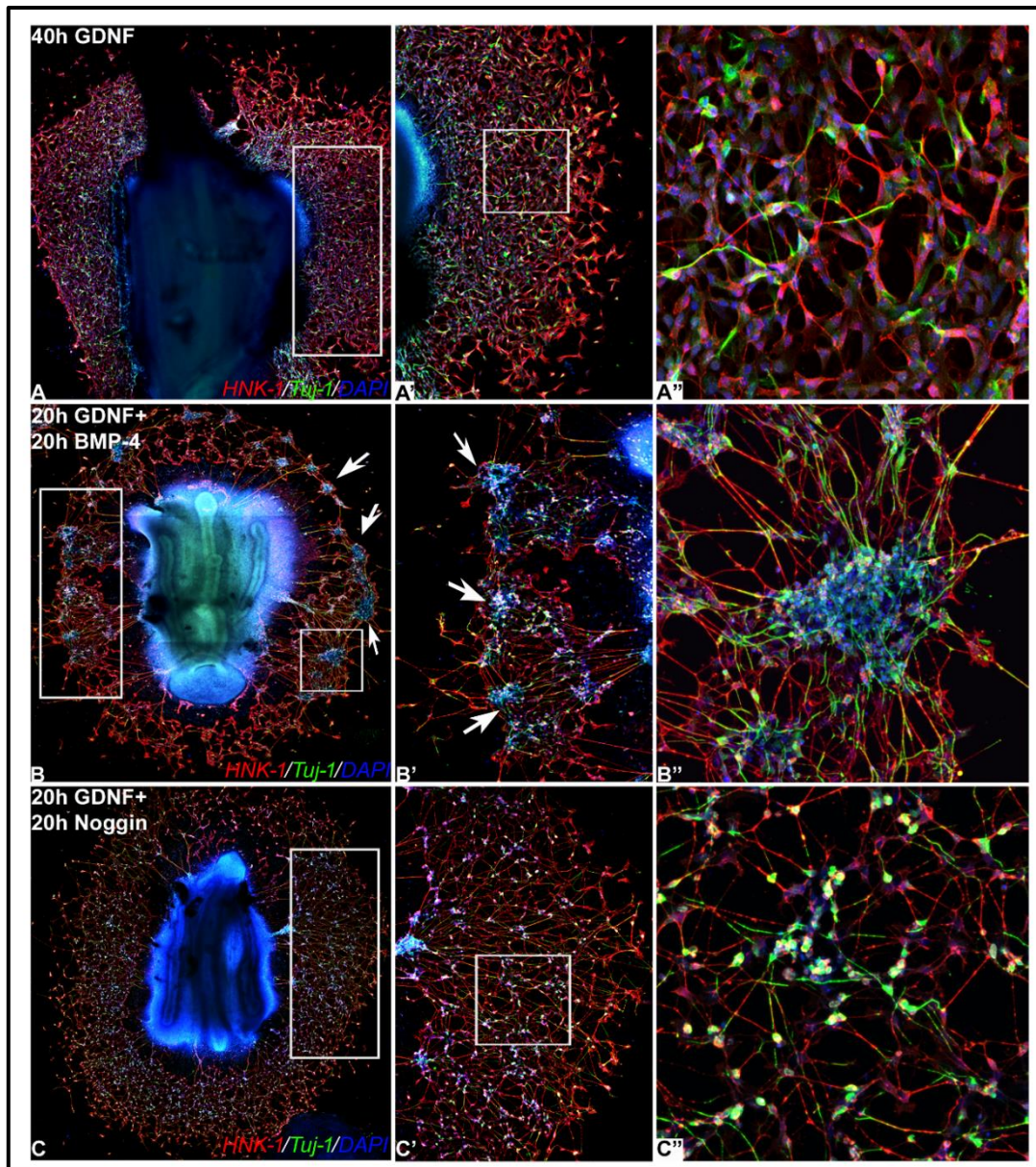
A BMP-4 jelátvitel hatását az ENCC sejtek migrációjára már számos kutatócsoport tanulmányozta különböző kísérleti rendszerekben, azonban ellentmondásos eredmények születtek. Csirke embriók ENCC sejtjein végzett 3D migrációs kísérletekben a Noggin kezelés gátolta a sejtek vándorlását (Goldstein és mtsai. 2005). Ezzel ellentétben egér embriókon végzett kísérletek azt mutatták ki, hogy a BMP-4 gátolta, a Noggin pedig serkentette az ENCC sejtek migrációját (Fu és mtsai. 2006). Az ellentmondásos eredmények feloldására megvizsgáltam az ENCC sejtek migrációját kollagén-gélben. A kísérletben hat napos csirke embriókból izolált coecumtelepeket használtam fel (hat napos korban a “wavefront” ENCC sejtek a coecum telepében vannak). A coecumokat 48 órán át tenyésztettem, kontroll (növekedési faktort nem tartalmazó), BMP-4 vagy Noggin növekedési faktort tartalmazó kollagén gélben, majd az eredményeket inverz mikroszkóp segítségével értékeltem ki. Amikor 48 óráig növekedési faktort nem tartalmazó DMEM médiumban voltak tenyésztve a coecumtelepek, sejt-vándorlás nem, vagy csak nagyon kis mértékben volt megfigyelhető (11. ábra, A kép). GDNF kemoattraktáns hiányában a sejtek nem vándoroltak a kollagén-mátrixba. 48 órás BMP-4+GDNF kezelés hatására intenzív sejt-vándorlás figyelhető meg, tehát a BMP-4 nem gátolta a GDNF-indukált sejt-migrációt. (11. ábra, B kép). 48 órás inkubálást követően a Noggin tartalmazó kollagén-gélben tenyésztett coecumból nem történt jelentős sejt-kivándorlás. Eredményeim alapján kijelenthető, hogy a Noggin gátolta az ENCC sejtek GDNF által indukált migrációját (11. ábra C kép)



**11. ábra. A BMP-4 jelátvitel hatása a GDNF-indukált ganglionléc-eredetű sejtek migrációjára.** (A) 6 napos csirke embrió coecum telepének sztereomikroszkópos képe 48 órával a kontroll médiumban történő tenyésztés. A szaggatott vonalak jelzik a vándorló sejtek által megtett távolságot (144µm). (B) A GDNF és BMP-4-et tartalmazó kollagén-gélben tenyésztett embrionális coecum képe intenzív sejt-vándorlást mutat, körülötte a kivándorló ENCC sejtek és vonalakkal az általuk megtett távolságok (808µm). (C) A GDNF és Noggin tartalmazó kollagén-gélben tenyésztett embrionális coecum, a kivándorló ENCC sejtek által megtett távolságok jelenős mértékben lecsökkentek (254µm).

## 5.5 A BMP-4 növekedési faktor közvetlen hatása a ganglionléc-eredetű sejtekre *in vitro* sejtenyészetben.

Munkám során megvizsgáltam, hogyan reagálnak az ENCC sejtek a BMP-4 és Noggin rekombináns fehérjék közvetlen jelenlétére sejtenyészetben. A kísérlet során szintén 6 napos csirke embriók coecum telepeit fibronectinnel bevont műanyag Petri-csészébe tenyésztettem. Az embrionális coecumokból 20 órás GDNF (10ng/ml) kezelés hatására nagyszámú ENCC sejt vándorolt ki. 3 csoportot kialakítva a sejtenyészetekhez vagy BMP-4-et (100ng/ml), illetve Noggin (200ng/ml) adtam, vagy engedtem tovább GDNF-ben (kontroll). A módszer előnye, hogy GDNF-el kivándoroltatott ENCC sejtekre közvetlen BMP-4 és Noggin hatást lehet vizsgálni. PFA fixálás után kettős immunfluoreszcens technikával megjelöltem az ENCC sejteket, az eredményt konfokális mikroszkóp rendszer segítségével értékeltem ki (12. ábra). 40 óra GDNF kezelés hatására a kivándorolt sejtek egy egységes, homogén sejtréteget képeztek a fibronectinnel bevont Petri-csésze felületén (12. ábra, A kép), a sejtek tömören helyezkednek el egymás mellett (12. ábra, A', A'' kép). A 20 órás GDNF kezelés után a tenyésztő médiumot 3x5 perces PBS mosással BMP-4 faktort tartalmazó tápoldatra cseréltem. BMP-4 morfogén hatására az ENCC sejtek csoportokba tömörültek, aggregátumokat képeztek (12. ábra, B, B' kép, nyílhegyek) és számos ganglionhoz hasonló képletet (12. ábra, B'' kép) hoztak létre. BMP-4 kezelés hatására kialakuló ganglionokat egér embriókkal végzett *in vitro* kísérleti rendszerek esetén is leírtak (Chalazonitis és mtsai. 2004). A BMP-4 kezelés nem eredményezett fasciculációt a csirke coecum tenyészetben ellentétben a korábbi, egér embriókkal végzett *in vitro* kísérletekkel, melyek a fasciculusok megnövekedését mutatják (Fu és mtsai. 2006), illetve ellentétben azzal, melyet az *ex vivo* tenyésztett embrionális szervek falában én is tapasztaltam (9. ábra, B3 kép). Noggin kezelés esetén nem tapasztaltam ganglionképződést, a sejtek nem alkottak aggregátumokat, ezzel ellentétben látszólag egy lazább struktúrájú sejhálózatot hoztak létre a coecum körül (12. ábra, C kép), amelyben a sejtek elszórtabban helyezkednek el egymás mellett, nagyobb sejtközötti területeket zárva közre (12. ábra, C', C'' kép).



**12. ábra.** A BMP-4 jelátvitel az ENCC sejtek aggregációját váltja ki *in vitro* tenyésztésben. 6 napos csirke embriókból izolált coecum fibronektinén történő tenyésztése GDNF (A-A''), GDNF+ BMP4 (B-B'') és Noggin (C-C'') jelenlétében. Kettős immunfluoreszcens festés a coecumból kivándorolt ganglionléc-eredetű sejteket (HNK-1 ganglionlécsejt-marker: piros) és a korai neuronokat (Tuj-1 béta-III-tubulin: zöld) jelöli. (A) A GDNF kezelés hatására a coecumból intenzív sejt kivándorlás figyelhető meg. (A') Az A képen bekeretezett terület nagyobb felbontású felvétele. (A'') Az A' kép bekeretezett részének nagyobb felbontású felvétele. (B) A BMP-4 kezelés hatására a sejttenyésztésben ganglionok alakultak ki (nyílhegyek). (B') A B képen bekeretezett ganglionok nagyobb felbontású felvétele, a nyílhegyek a ganglionokat jelzik. (B'') A B képen négyzettel bekeretezett ganglion nagyobb felbontású felvétele. (C) Noggin kezelés eredménye, a kivándorolt sejtek egyenletes eloszlása figyelhető meg. (C') A C képen bekeretezett terület nagyobb felbontású felvétele. (C'') A C' kép bekeretezett részének nagyobb felbontású felvétele.

## VI. Következtetések levonása

Az elmúlt években sok adat gyűlt össze a bélidegrendszer fejlődésével és működésével kapcsolatban, mégis viszonylag kevés információval rendelkezünk a bélidegrendszert érintő veleszületett megbetegedések háttéréről és embrionális kialakulásának mechanizmusáról. A fejlődési anomáliák közül a hipoganglionózissal, illetve a hiperganglionózissal és ektópiás ganglionok megjelenésével együtt járó neurodiszpláziák és az aganglionózissal jellemzett Hirschsprung-kór a leggyakoribb. Ezen betegségek háttérében már bizonyítottan a mesenchymális GDNF és endothelin-3 növekedési faktorok jelátviteli folyamataiban fellépő genetikai elváltozások állnak. A szintén mesenchymális eredetű BMP-4 növekedési faktor a bélidegrendszer embrionális fejlődésben betöltött szerepéről számos kutatás beszámolt már, azonban a különböző *in vivo*, *in vitro* rendszerekben és eltérő modellszervezetekben végzett kísérletek egymással ellentétes eredményeket mutattak. Szakdolgozati munkám célja az volt, hogy az embriológia klasszikus modellállatában, a csirke embrióban, megvizsgáljam a BMP-4 jelátvitel hatását az utóbél bélidegrendszer fejlődésére.

Első lépésben *in situ* hibridizációval igazoltam, hogy a BMP-4 expresszió már az 5 napos embrionális korban kimutatható az utóbél mesenchymális sejtjeiben. Eredményeim szerint a korai enterális idegrendszeri elemek nem rendelkeznek BMP-4 expresszióval annak ellenére, hogy korábbi adatok ezt kimutatták (Goldstein és mtsai., 2005). Érdekesség, hogy az ENCC sejtek viszont Noggint termelnek, ezzel gátolják a mesenchymából érkező BMP-4 molekulák hatását és szabályozzák a bélidegrendszer korai fejlődését. A továbbiakban érdemes több stádiumban megvizsgálni az enterális ganglionok BMP-4 expresszióját.

Szakdolgozati munkám második részében sejt- és szervtenyészeteken végzett kísérletekkel vizsgáltam a BMP-4 hatását a bélidegrendszer fejlődésére. A BMP-4-ről ismert, hogy gátolja a simaizom differenciálódást, s ezáltal kijelöli az embrionális bélfal simaizomszövetének helyét. A BMP-4 ezzel nem csak hozzájárul a bél radiális szimmetriájának kialakulásához, hanem közvetve irányítja a ganglionléc sejtek megfelelő vándorlását, a bélidegrendszer koncentrikus mintázatának kialakulását (Sukegawa és mtsai., 2000, Huycke és mtsai. 2019). Eredményeim szerint függesztett szervtenyészetekhez hozzáadott exogén BMP-4 az utóbél már kialakult simaizomszövet mintázatát nem változtatta meg, azonban jelentős változás lépett fel a bélidegrendszer morfológiájában. BMP-4 hatására a bélfalban ektópikus helyzetű és rendellenes méretű ganglionok figyelhetők meg, valamint eddig még le nem írt hipertrófiázott idegrostok jelentek meg a bélfalban. E morfológiai kép nagyon hasonlít a veleszületett neurointesztinális kórképek hisztopatológiás megjelenéséhez. A függesztett szervtenyészetekben tartott bélszakaszokban az ECM egyes komponenseinek megváltozott

expresszióját figyeltük meg. BMP-4 hatására a sejt migrációt gátló ECM molekulák (CSPG, tenascin) kifejeződése fokozottabbá vált. Feltételezzük, hogy ez is hozzájárult a Noggin kezelt utóbelek esetén látott hipoganglionotikus disztális utóbél és rendellenes bélidegrendszer fejlődéshez. Ezt a megfigyelést megerősítik azok a kutatások, amelyek kimutatták ezen ECM molekulák expressziójának megváltozását Hirschsprung-kóros betegek esetén az érintett bélszakaszokban (Parikh és mtsai. 1994, Zhang és mtsai. 1994)

Kollagén-gélbe ágyazott 6 napos coecumokkal kapott eredményeim igazolják a korábban csirke embriókkal végzett *in vivo* kísérletek eredményeit, miszerint a Noggin gátolja a ganglionléc eredetű sejtek migrációját. A jövőben érdemes lesz megvizsgálni emlős embriónális utódok függesztett szervtenyészetét is, mivel az egér embriókból származó *in vitro* eredmények ellentmondásosnak bizonyultak

Fibronektinnel bevont felszínre kivándoroltatott sejtenyészetben végzett kísérleteim azt célozták meg, hogy megvizsgáljam a BMP-4 növekedési faktor és antagonistáinak közvetlen hatását a bélidegrendszert kialakító ganglionléc eredetű sejtekre. Eredményeim a már korábban leírt BMP-4 által indukált gangliogenezist mutatták (Fu és mtsai. 2006). Noggin kezelés hatására Szakdolgozatien nem képződtek ganglionok, inkább úgy tűnt, hogy a sejtek eltávolodtak egymástól és egy lazább sejt-hálózatot hoztak létre. Ez utalhat arra is, hogy az ENCC sejtek által termelt endogén Noggin ellenentétes hatást vált ki a BMP-4 sejtaggregáló hatásának, így szabályozva az enterális ganglionok megfelelő kialakulását. Következő kísérleteim során kvantitatív összehasonlítást tervezek végezni, hogy megvizsgáljuk a BMP-4 és Noggin kezeléseket ENCC proliferációra és differenciáció szintjére kifejtett hatását, kiegészítve a neuronális és glia irányú differenciálódással

Összefoglalva, az embrionális bélben termelődő mesenchymális eredetű BMP-4 növekedési faktor esszenciális szerepet tölt be az ENCC sejtek migrációjának támogatásában és a folyamatot szabályozó megfelelő extracelluláris mátrix mintázat kialakításában, a fejlődő utóbél falában történő gangliogenezis szabályozásában és így a bélidegrendszer embrionális fejlődésében.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek, dr. Nagy Nándornak segítőkész támogatásáért és Szakdolgozati munkám koordinálásáért. Köszönöm a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetnek, hogy helyszínt biztosított a Szakdolgozati munkám kísérleteinek elvégzéséhez, valamint az Apáthy István Alapítványnak és a Makovecz Hallgatói Ösztöndíjprogramnak a kutatási tevékenységem támogatásáért. Továbbá hálával tartozom az Óssejt és Szakdolgozati Embriológia laboratórium minden tagjának, hogy saját munkájuk mellett engem is támogattak. Köszönettel tartozom a laboratórium Phd hallgatóinak, Kovács Tamásnak és Halasy Viktóriának akik munkám során mindvégig támogattak, Soós Ádámnak és Szöcs Emőkének, dr. Dóra Dávidnak a hasznos szakmai tanácsokért és Csenkey Anikó, Jancsovics Dalma laborasszisztenseknek, hogy a kísérleteim során segítségemre voltak.

## Irodalom

Akbareian, S. E., Nagy, N., Steiger, C. E., Mably, J. D., Miller, S. A., Hotta, R., ... & Goldstein, A. M. (2013) Enteric neural crest-derived cells promote their migration by modifying their microenvironment through tenascin-C production. *Developmental biology*, **382**(2), 446-456.

Asai, T. Fukuda, Z. Wu, A. Enomoto, V. Pachnis, M. Takahashi, F. Costantini. (2006) Targeted mutation of serine 697 in the Ret tyrosine kinase causes migration defect of enteric neural crest cells, *Development*, **133** (22), 4507–4516.

Ayer-Le Lievre, C. S., & Le Douarin, N. M. (1982) The early development of cranial sensory ganglia and the potentialities of their component cells studied in quail-chick chimeras. *Developmental biology*, **94**(2), 291-310.

Bayliss, W. M., & Starling, E. H. (1899) The movements and innervation of the small intestine. *The Journal of physiology*, **24**(2), 99-143.

Breau, M. A., Dahmani, A., Broders-Bondon, F., Thiery, J. P., & Dufour, S. (2009)  $\beta$ 1 integrins are required for the invasion of the caecum and proximal hindgut by enteric neural crest cells. *Development*, **136**(16), 2791-2801.

Bronner, M. E., & LeDouarin, N. M. (2012) Development and evolution of the neural crest: an overview. *Developmental biology*, **366**(1), 2-9.



Brookes, S. J. (2001) Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, **262**, 58-70.

Burns, A. J., Delalande, J. M. M., & Le Douarin, N. M. (2002) In ovo transplantation of enteric nervous system precursors from vagal to sacral neural crest results in extensive hindgut colonisation. *Development*, **129**(12), 2785-2796.

Chalazonitis, A., & Kessler, J. A. (2012) Pleiotropic effects of the bone morphogenetic proteins on development of the enteric nervous system. *Developmental neurobiology*, **72**(6), 843-856.

Chalazonitis, A., D'Autréaux, F., Guha, U., Pham, T. D., Faure, C., Chen, J. J., ... & Gershon, M. 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'Autréaux, F., Pham, T. D., Kessler, J. A., & Gershon, M. D. (2011) Bone morphogenetic proteins regulate enteric gliogenesis by modulating ErbB3 signaling. *Developmental biology*, **350**(1), 64-79.

D'amico-Martel, A., & Noden, D. M. (1983) Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *American Journal of Anatomy*, **166**(4), 445-468.

de Santa Barbara, P., Williams, J., Goldstein, A. M., Doyle, A. M., Nielsen, C., Winfield, S., ... & Roberts, D. J. (2005) Bone morphogenetic protein signaling pathway plays multiple roles during gastrointestinal tract development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **234**(2), 312-322.

Ding, X., Zhao, Z., Duan, W., Wang, S., Jin, X., Xiang, L., & Jin, X (2013) Expression patterns of CXCR4 in different colon tissue segments of patients with Hirschsprung's disease. *Experimental and molecular pathology*, **95**(1), 111-116.

Dutt, S., Matasci, M., Sommer, L., & Zimmermann, D. R. (2006) Guidance of neural crest cell migration: the inhibitory function of the chondroitin sulfate proteoglycan, versican. *TheScientificWorldJOURNAL*, **6**, 1114-1117.

Fei, T., Xia, K., Li, Z., Zhou, B., Zhu, S., Chen, H., ... & Chen, Y. G. (2010) Genome-wide mapping of SMAD target genes reveals the role of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination. *Genome research*, **20(1)**, 36-44.

Fu, M., Lui, V. C. H., Sham, M. H., Pachnis, V., & Tam, P. K. H. (2004) Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *The Journal of cell biology*, **166(5)**, 673-684.

Fu, M., Tam, P. K. H., Sham, M. H., & Lui, V. C. H. (2004) Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study. *Anatomy and embryology*, **208(1)**, 33-41.

Fu, M., Vohra, B. P., Wind, D., & Heuckeroth, R. 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.

Fujiwara, N., Nakazawa-Tanaka, N., Miyahara, K., Arikawa-Hirasawa, E., Akazawa, C., & Yamataka, A. (2018) Altered expression of laminin alpha1 in aganglionic colon of endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's disease. *Pediatric surgery international*, **34(2)**, 137-141.

Furness, J. B. (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system*, **81(1-3)**, 87-96.

Furness, J. B. (2006) *The Enteric Nervous System*. Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, USA

Furness, J. B. (2012) The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, **9**, 286-294.

Furness, J. B., & Stebbing, M. J. (2017) The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. *Neurogastroenterology & motility*, **30(2)**

Furness, J. B., & M. Costa (1980) Types of nerves in the enteric nervous system. *Commentaries in the Neurosciences*, 235-252.

Gabriel, S. B., Salomon, R., Pelet, A., Angrist, M., Amiel, J., Fornage, M., ... & Chakravarti, A. (2002) Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nature genetics*, **31(1)**, 89-93.

Gans, C., & Northcutt, R. G. (1983) Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. *Science*, **220(4594)**, 268-273.

Gao, N., Wang, J., Zhang, Q., Zhou, T., Mu, W., Hou, P., ... & Li, A. (2020) Aberrant Distributions of Collagen I, III, and IV in Hirschsprung Disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **70(4)**, 450-456.

Gilbert, S. F., & Barresi, Michael J.F. (2016) *Developmental biology*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, United States

Goldstein, A. M., & Nagy, N. (2008) A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo. *Pediatric research*, **64(4)**, 326-333.

Goldstein, A. M., Brewer, K. C., Doyle, A. M., Nagy, N., & Roberts, D. 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.

Gunn, M. (1951). A study of the enteric plexuses in some amphibians. *Journal of Cell Science*, **3(17)**, 55-77.

Hall, B. K. (1998) Germ layers and the germ-layer theory revisited. *Evolutionary biology*, 121-186.

His, W. (1868). Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbelthierleibes: die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei, *FCW Vogel*, **1**

Holschneider, A. M., & Puri, P. (2008). Hirschsprung's disease and allied disorders (pp. 115-123). Berlin: Springer.

- Huycke, T. R., Miller, B. M., Gill, H. K., Nerurkar, N. L., Sprinzak, D., Mahadevan, L., & Tabin, C. J. (2019) Genetic and Mechanical Regulation of Intestinal Smooth Muscle Development. *Cell*, **179**(1), 90–105.e21.
- Kapur, R. P. (2000). Developmental disorders of the enteric nervous system. *Gut*, 47(suppl. 4), iv81-iv83.
- Kléber, M., Lee, H. Y., Wurdak, H., Buchstaller, J., Riccomagno, M. M., Ittner, L. M., ... & Sommer, L. (2005) Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling. *The Journal of cell biology*, **169**(2), 309-320.
- Lamanna, C., Costagliola, A., Vittoria, A., Mayer, B., Assisi, L., Botte, V., & 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.
- 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. *Development*, **30**(1), 31-48.
- Leenders, E., & Sieber, W. K. (1970). Congenital megacolon observation by Frederick Ruysch- 1691. *Journal of pediatric surgery*, **5**(1), 1-3.
- Miyazono, K., Maeda, S., & Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & growth factor reviews*, **16**(3), 251-263.
- Mccallion, A. S., & Chakravarti, A. (2001) EDNRB/EDN3 and Hirschsprung disease type II. *Pigment Cell Research*, **14**(3), 161-169.
- Nagy, N., Barad, C., Graham, H. K., Hotta, R., Cheng, L. S., Fejszak, N., & Goldstein, A. M. (2016) Sonic hedgehog controls enteric nervous system development by patterning the extracellular matrix. *Development*, **143**(2), 264-275.
- Nagy, N., Brewer, K. C., Mwizerwa, O., & Goldstein, A. M. (2007) Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **236**(1), 73-83.

- Nagy, N., Burns, A. J., & Goldstein, A. M. (2012). Immunophenotypic characterization of enteric neural crest cells in the developing avian colorectum. *Developmental Dynamics*, **241**(5), 842-851.
- Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2006). Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Developmental biology*, **293**(1), 203-217.
- Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2017). Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Seminars in cell & developmental biology*, **66**, 94-106.
- Nagy, N., Guyer, R. A., Hotta, R., Zhang, D., Newgreen, D. F., Halasy, V., ... & Goldstein, A. M. (2020) RET overactivation leads to concurrent Hirschsprung disease and intestinal ganglioneuromas. *Development*, **147**(21).
- Nagy, N., Mwizerwa, O., Yaniv, K., Carmel, L., Pieretti-Vanmarcke, R., Weinstein, B. M., & Goldstein, A. M. (2009) Endothelial cells promote migration and proliferation of enteric neural crest cells via  $\beta$ 1 integrin signaling. *Developmental biology*, **330**(2), 263-272.
- Obermayr, F., Hotta, R., Enomoto, H., & Young, H. M. (2013) Development and developmental disorders of the enteric nervous system. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, **10**(1), 43.
- Parikh, D. H., Tam, P. K. H., Van Velzen, D., & Edgar, D. (1994) The extracellular matrix components, tenascin and fibronectin, in Hirschsprung's disease: An immunohistochemical study. *Journal of pediatric surgery*, **29**(10), 1302-1306.
- Parikh, D. H., Tam, P. K., Van Velzen, D., & Edgar, D. (1992) Abnormalities in the distribution of laminin and collagen type IV in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology*, **102**(4), 1236-1241.
- Pattyn, X., Morin, H., Cremer, C., Goidis, J.F., Brunet. (1999) The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives, *Nature*, **399**, 366–370.
- Sasselli, V., Pachnis, V., & Burns, A. J. (2012) The enteric nervous system. *Developmental biology*, **366**(1), 64-73.

Roberts, D. J., Johnson, R. L., Burke, A. C., Nelson, C. E., Morgan, B. A., & Tabin, C. (1995) Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development*, **121(10)**, 3163-3174.

Schemann, M. (2005) Control of gastrointestinal motility by the “gut brain”- the enteric nervous system. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **41**, S4-S6.

Schmittenebecher, P. P., Sacher, P., Cholewa, D., Haberlik, A., Menardi, G., Moczulski, J., ... & Ure, B. (1999) Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia—a frequent association with implications for the postoperative course. *Pediatric surgery international*, **15(8)**, 553-558.

Sedlmeier, G., & Sleeman, J. P. (2017). Extracellular regulation of BMP signaling: welcome to the matrix. *Biochemical Society transactions*, **45(1)**, 173-181.

Selleck, M. A., & Bronner-Fraser, M. (1995) Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions. *Development*, **121(2)**, 525-538.

Serbedzija, G. N., Bronner-Fraser, M., & Fraser, S. E. (1994) Developmental potential of trunk neural crest cells in the mouse. *Development*, **120(7)**, 1709-1718.

Swenson, O., Rheinlander, H. F., & Diamond, I. (1949) Hirschsprung's disease: A new concept of the etiology: Operative results in thirty-four patients. *New England Journal of Medicine*, **241(15)**, 551-556.

Sukegawa, A., Narita, T., Kameda, T., Saitoh, K., Nohno, T., Iba, H., ... & Fukuda, K. (2000) The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development*, **127(9)**, 1971-1980.

Wallace, A. S., & Burns, A. J. (2005). Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell and tissue research*, **319(3)**, 367-382.

Yin, X., Yang, S., Zhang, M., & Yue, Y. (2019). The role and prospect of JMJD3 in stem cells and cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **118**, 109384.

Yntema, C. L., & Hammond, W. S. (1954) The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *Journal of Comparative Neurology*, **101(2)**, 515-541.

Young, H. M., & Newgreen, D. (2001). Enteric neural crest-derived cells: origin, identification, migration, and differentiation. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, **262**(1), 1-15.

### **Kivonat**

A bélidegrendszer (ENS) a gasztrointesztinális traktus falában található neuron és gliasejtekből álló hálózat, amelyet az embrionális fejlődés során a ganglionlécből származó idegi őssejtek hoznak létre. A ganglionléc sejtek migrációjának hibája Hirschsprung-kórt okoz, amit a vastagbél saját idegrendszerének hiánya jellemez. Az embrionális bél mesenchymális sejtjei BMP (bone morphogenetic protein) típusú növekedési faktorokat termelnek, amelyek fenntartják a bélfal rétegeinek radiális szimmetria mentén történő differenciálódását. Korábbi modellszervezeteken végzett kísérletek és humán genetikai vizsgálatok felvetik annak a lehetőségét, hogy a BMP-4 szerepet játszik a ganglionléc-sejtek vándorlásában és a bélidegrendszer differenciálódásában. Mindezen adatok alapján feltételeztük, hogy a bélidegrendszer fejlődésében a BMP-4 morfogén fontos szerepet játszhat.

Kísérleteink során *in situ* hibridizációval kimutattuk, hogy a BMP-4 korai kifejeződése a csirke embrió coecum és az utóbél mesenchyma sejtjeire korlátozódik és már az ötödik embrionális napon kimutatható az fejlődő utóbél mesenchymájában. Korábbi kísérletekből ismert, hogy a BMP-4 gátlószere a Noggin fehérje. Rekombináns Noggin fehérje embrionális bél szervtenyészetéhez adva meggátolta a

ganglionléc sejtek vándorlását, a disztális embrionális vastagbélben ganglionmentes szakasz alakult ki. BMP-4 hozzáadása után rendellenes helyzetű és abnormális méretű ganglionok képződtek. Hat napos embrionális bélszakaszokat kollagén gélben, illetve fibronectin felszínén tenyésztettük, ahol a BMP-4 hatására a ganglionléc sejtek intenzív kivándorlása és a neurális sejtek aggregációja volt megfigyelhető. Amikor a BMP-4 antagonista Noggin növekedési faktorról kezeltük az embrionális bélszakaszokat, akkor ellentétes eredményt kaptunk; a Noggin hatása gátolta a sejt vándorlást és nem eredményezett sejtaggregátumokat.

Eredményeink azt mutatják, hogy a BMP4 jelátvitel zavara embrionális béltenyészetekben a vastagbél idegrendszerének rendellenes fejlődését eredményezi, amelynek fenotípusa hasonlít a humán Hirschsprung-kór ganglionmentes szakaszokból és ectopikus ganglionokból álló bélidegrendszerére.

## Rezumat

Sistemul nervos enteral este o rețea neurală situată în peretele intestinală formată de neuroni și celule gliale, care este creată de celule stem provenite din lamela ganglială în timpul dezvoltării embrionare. Eroarea în migrația celulelor stem în peretele intestinală cauzează boala lui Hirschsprung, caracterizată prin lipsa ganglionii neurale a sistemului nervos enteral în colon. În timpul dezvoltării embrionare celulele embrionare mesenchymale ale intestinului produc un factor morfogenetic BMP-4, care contribuie la diferențierea straturilor peretelor intestinale printr-o simetrie radială. Datele obținute prin experimentele anterioare pe organisme modele și datele din analize genetice umane ridică posibilitatea că factorul morfogenetic BMP-4 contribuie și la migrația celulelor stem din lamela ganglială și la diferențierea sistemului nervos enteral. Pe baza acestor date am formulat ipoteza, că factorul morfogenetic BMP-4 are un rol esențial în diferențierea și formarea sistemului nervos enteral în timpul dezvoltării embrionare.

În experimentele noastre, am demonstrat prin hibridizare *in situ* că expresia timpurie a BMP-4 este limitată la celulele mesenchymale metenteronale și poate fi detectată în mesenchymul metenteronului în curs de dezvoltare încă din a cincea zi embrionară. Din experimente anterioare iese în evidență că



proteina Noggin este antagonista factorului BMP-4, care blochează transmiterea semnalelor produse de BMP-4. Adăugarea Nogginului recombinant la cultura de organe embrionare de colon s-a rezultat prin inhibarea migrației celulelor stem, s-a dezvoltat o secțiune fără ganglioni în colonul embrionar distal. După adăugarea BMP-4, s-au format ganglioni poziționați anormal și de dimensiuni anormale. Am cultivat secțiuni intestinale embrionare de șase zile pe gel de collagen și, respectiv, pe suprafața fibronectinei, și am observat că BMP-4 a indus migrația intensivă a celulelor germinale ganglionare și agregarea celulelor neuronale. Când organele embrionare au fost tratate cu Noggin, antagonist BMP-4, s-a obținut rezultatul opus; efectul Noggin a inhibat migrarea celulelor și nu a avut ca rezultat agregate celulare.

Rezultatele noastre evidențiază că interferența semnalului indus de factorul morfogenetic BMP-4 în culturile de organe embrionare rezultă dezvoltarea anormală a sistemului nervos enteral cu un fenotip similar cu cel al bolii umane Hirschsprung, constând din secțiuni fără ganglioni enterale și ganglioni ectopici.