

# SZAKDOLGOZAT

## **A Sonic hedgehog növekedési faktor hatása a vastagbél idegrendszer fejlődésére**

Készítette:

Barad Csilla Mária

SE ÁOK VI. évfolyam

Témavezető:

Dr. habil. Nagy Nándor

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet, Budapest



Budapest, 2014

## Tartalomjegyzék

I.	Bevezetés: .....	4
II.	Irodalmi áttekintés:.....	5
2.1.	A bélidegrendszer általános felépítése:.....	5
2.2.	A bélidegrendszer embryonális fejlődése: .....	7
2.3.	A bélidegrendszert érintő neurocristopathiák; Hirschsprung-kór:.....	8
2.4.	Hirschsprung-kór hátterében álló molekuláris mechanizmusok:.....	11
2.5.	A madár embryo, mint kísérleti modell: .....	16
III.	Célkitűzések.....	17
IV.	Anyagok és módszerek:.....	18
4.1.	Kísérleti állatok.....	18
4.2.	A minták szövettani feldolgozása .....	18
4.2.1.	Zselatinos-szacharózos fagyasztott blokk készítése .....	18
4.2.2.	Beágyazáshoz használt oldatok .....	19
4.3.	Fagyasztott metszetek készítése.....	19
4.4.	Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia .....	19
4.4.1.	<i>Immunhisztokémia</i> .....	19
4.4.1.1.	„Whole mount” immunfestés: .....	20
4.4.2.	Immunfluoreszcencia.....	21
4.4.2.1.	Egyszeres immunfluoreszcens festés .....	21
4.4.2.2.	Kettős immunfluoreszcens festés .....	21
4.5.	Az immunfestés során felhasznált primer és secunder ellenanyagok táblázatos összefoglalása .....	22
4.6.	Felhasznált oldatok, előhívószerke .....	24
	Kloronaftol törzsoldat készítése:.....	24
	1%-os PBS-BSA: .....	24
	Diamino-benzidin (DAB) készítése: .....	24
4.7.	Sejtosztódás kimutatása bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine: BrdU) jelöléssel.....	24
4.8.	Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás .....	25
4.9.	Embryomanipuláció .....	25
4.9.1.	Embryotenyészet .....	25

4.9.1.1.	A kollagén mátrix elkészítése .....	25
4.9.1.2.	Chorioallantois membrántenyésztés (CAM).....	26
4.9.2.	Shh-RCAS retrovírus és cacloamine mikroinjektálása .....	27
V.	Eredmények:.....	28
5.1.	A vastagbél idegrendszer kialakulása csirke embryoban.....	28
5.2.	A sonic hedgehog jelátvitel hatásának <i>in vitro</i> vizsgálata a vastagbél idegrendszer embryonalis fejlődése során.....	32
5.3.	A Sonic hedgehog jelátvitel hatásának <i>in vivo</i> vizsgálata a vastagbél idegrendszer embryonalis fejlődésére. ....	35
5.4.	A sonic hedgehog hatása a bél extracelluláris mátrixára. ....	40
5.5.	Az epitheliális Shh és a mesenchymális GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor) növekedési faktor kölcsönhatásának vizsgálata.....	41
VI.	Eredmények megbeszélése és konklúzió:.....	43
VIII.	Köszönetnyilvánítás .....	48
IX.	Irodalomjegyzék .....	49

## I. Bevezetés:

A bélidegrendszer a bélfalban található neuronok és gliasejtek kiterjedt hálózata, a perifériás idegrendszer legnagyobb részét képezi. Az elmúlt években meglepő felfedezések láttak napvilágot a bélidegrendszerrel kapcsolatban. Bár az orvostudomány sokáig úgy gondolta, hogy az agy egyeduralnoként szabályozza az egész szervezetet, a bélidegrendszerrel kapcsolatos kutatások egyre inkább azt igazolják, hogy bélsatorna idegrendszere jelentős részben a központi idegrendszertől függetlenül működik. Éppen ezért nem meglepő, hogy egyre inkább "második agynak" kezdik nevezni. Mindezt alátámasztja az a morfológiai tény is, hogy a béltraktusban található idegsejtek száma meghaladja a gerincvelő idegsejtjeinek a számát.

A bélidegrendszert egy sor olyan veleszületett vagy szerzett rendellenesség érintheti, amely a neuronhálózat normális működését zavarja meg vagy a neuronok hiányához vezethet. A kialakult neuropathiák gyógyítása az egyik legnagyobb kihívást jelenti a klinikumban. A fejlődő bélidegrendszert érintő legismertebb patológiai elváltozás a veleszületett megacolon, más néven Hirschsprung-kór, amit a vastagbél teljes idegrendszerének hiánya, abnormális fejlődése jellemez. Ez a fejlődési zavar az újszülöttek körében viszonylag nagy arányban fordul elő (1:5000). Habár az elmúlt évtizedekben számos izgalmas adat gyűlt össze a bélidegrendszer normális fejlődésével és működésével kapcsolatban, viszonylag kevés információval rendelkezünk az enterális idegrendszert érintő veleszületett megbetegedések molekuláris, fejlődésbiológiai hátteréről és kialakulásának mechanizmusáról. A bélidegrendszert érintő betegségek gyógyítása jelenleg csak sebészi úton lehetséges.

A napjainkban zajló intenzív őssejtkutatásoknak köszönhetően a Hirschsprung-kór kezelési alternatívájaként egyre többször merül fel a sejtttranszplantáció lehetősége. Ebben az esetben az idegi őssejteket vagy a progenitor sejteket posztnatális, felnőtt vagy Hirschsprung-kórban szenvedő páciensekből izolálják, majd a felszaporítás és differenciáltatás után az aganglionotikus bélszakaszba transzplantálják. Az indukált pluripotens őssejtek alkalmazása ugyancsak egy lehetséges gyógymódot jelenthet a jövőben. Az őssejtek terápiás célú sikeres alkalmazása ugyanakkor megkívánja az őssejteket befogadó mikrokörnyezet minél részletesebb megismerését is.

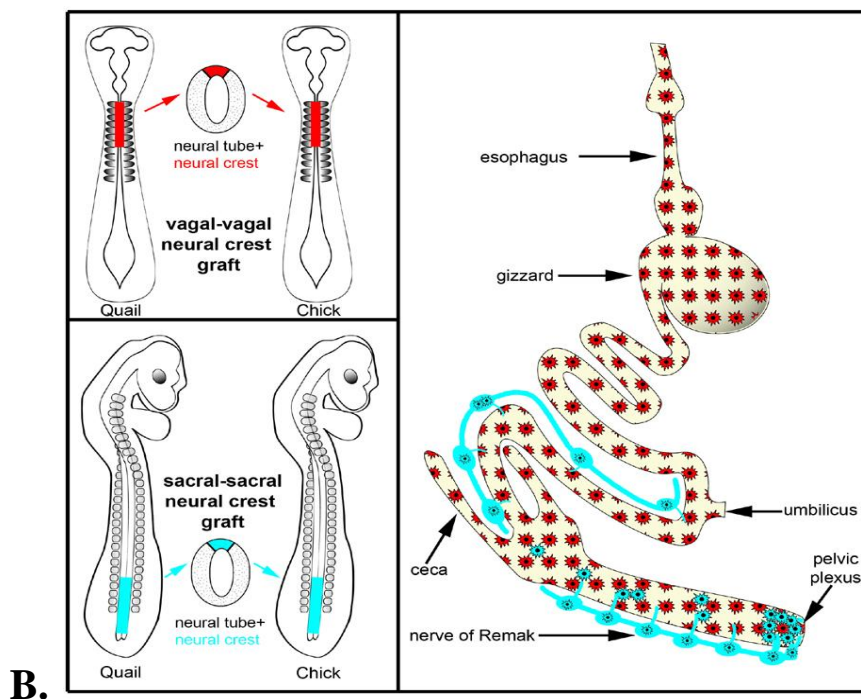
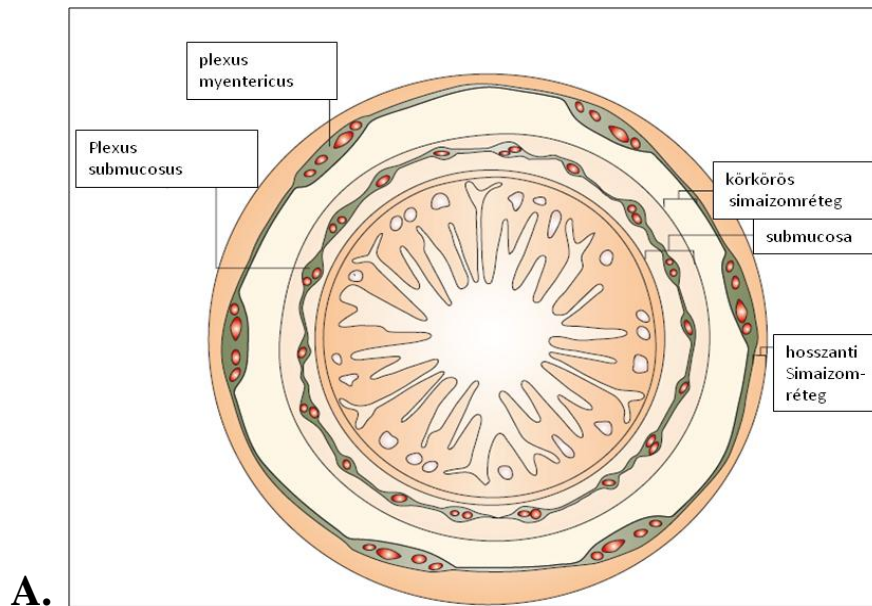
## II. Irodalmi áttekintés:

### 2.1. A bélidegrendszer általános felépítése:

A bélidegrendszer (enteric nervous system, ENS) a perifériás idegrendszer legnagyobb önálló egysége, ami a tápcsatorna teljes hosszában megtalálható neuronok és gliasejtek komplex hálózatából áll. (Furness és Costa, 1987). Az ENS mind strukturális, mind funkcionális szempontból szoros kapcsolatban áll az autonóm ganglionokkal és a központi idegrendszerrel. Egyes entericus neuronok axonjai a bélből kilépve a praevertebrális szimpatikus ganglionokhoz futnak, ahonnan az információ a központi idegrendszerbe kerül. Az ENS és a perifériás idegrendszer szoros kapcsolatát igazolja az a tény is, hogy a különböző szimpatikus és paraszimpatikus idegek posztganglionális rostjai szabályozzák az entericus ganglionok működését (Costa és mtsai., 2000; Furness, 2000), valamint a központi idegrendszer klasszikus ingerületátvivő anyagai megtalálhatóak a bélidegrendszerben (Furness és Costa, 1987).

Az ENS ugyanakkor nagymértékben független a központi idegrendszertől, megközelítőleg 100 millió idegsejt alkotja, s ezért gyakran „második agynak” is nevezik (Goldstein és mtsai., 2013).

Az enterális idegrendszert alkotó neuronok és gliasejtek ganglionokba szerveződve találhatóak a bélfal teljes hosszában. A ganglionokból álló idegrendszer két, koncentrikusan elhelyezkedő plexust alkot (**1. ábra**). A plexus myentericus, mely a hosszanti és a körkörös simaizomréteg között helyezkedik el, valamint a plexus submucosus, mely a körkörös simaizomréteg lumen felé eső oldalán található. A nervus vagus praeganglionális rostjai csak a duodenum magasságáig futnak, az ettől caudálisan elhelyezkedő bélszakasz beidegzéséért a bélidegrendszer plexusai felelősek. Az ENS-ben funkcionálisan 18 típusú neuron található, többek között érző, motoros és interneuronok, melyek lokális reflexíveket alkotnak. Ezek révén bélidegrendszer a gasztrointesztinális rendszer számos funkcióját szabályozza, úgymint a bél motilitását, víz- és ionszekréciót, vérellátást valamint az epehólyag és a hasnyálmirigy működését (Kirschgessner és Gershon, 1990).



**1. ábra: A.) A vékonybél keresztmetszetének sematikus ábrázolása.** Az entericus neuronok két plexus mentén ganglionokba rendeződnek (zöld). A külső, myentericus plexus a hosszanti és a körkörös simaizomréteg között található, míg a belső, submucosalis plexus a körkörös simaizomréteg lumenális oldalán lokalizálódik. (Forrás: Heanue TA, Pachnis V. (2007) Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease. *Nat Rev Neurosci.* 8(6):466-79.). **B.)** A bélidegrendszer a velőcső dorsalis területéről kivándorló ganglionléc sejtekből származik. Csirke-fürj embryokkal végzett kísérletekkel igazolták először, hogy a velőcső nyaki szakaszából kivándorló ganglionléc sejtek (1-8 őscsigolya magassága; vagal neural crest; piros szín) a béltraktus majdnem teljes idegrendszerét hozzák létre, amihez a velőcső caudális szakaszából (28. őscsigolyától caudalisan; sacral-neural crest; kék szín) kivándorló sejtek a rectum és részben a vastagbél idegrendszer kialakításával járulnak hozzá (Forrás: Goldstein AM, Nagy N. (2008) A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo. *Pediatr Res.* 64:326-33).

## 2.2. A bélidegrendszer embryonális fejlődése:

Az elmúlt pár évtizedben végzett fejlődésbiológiai kutatásoknak köszönhetően számos adat látott napvilágot a bélidegrendszer korai fejlődésére vonatkozólag. Csirke-fürj velőcső transzplantációs kiméra kísérletekkel igazolták először, hogy a bélidegrendszer őssejtjei a velőcső nyaki (vagalis régió: 1-7szomiták szintje) és az ágyéki (sacralis régió: 28 szomitától caudalisan) régiójából származnak (Burns és mtsai., 2002; Nagy és mtsai., 2007) **(1. ábra, B kép)**. Később, zebrahal, egér és patkány embryóban végzett kísérletekben is igazolták, hogy a teljes bélidegrendszer a velőcső eredetű sejtekből származik. Ezeket a velőcső eredetű sejteket ganglionlécnek vagy dúclécnek (crista neuralis) nevezik. A neuralizációt követően a ganglionlécből származó őssejtek a velőcső dorsalis területéről kilépve a bélcső irányába vándorolnak, majd az előbél magasságában belépnek a béltraktusba és a bélcső mesenchymájában craniocaudális irányba haladnak. A vándorlás során ezekből a sejtekből differenciálódnak a bélidegrendszert alkotó myentericus és submucosalis idegi plexusok neuronjai, illetve gliasejtjei. A bélfalban rostrocaudális irányba haladó ganglionléc sejtek a vándorlás során intenzíven osztódnak és differenciálódnak. Csirke embryo esetében a teljes szakaszát az embryonális fejlődés 3. és 8. napja között kolonizálják. Humán embryóban a ganglionléc sejtek craniocaudális migrációja az 5. gesztációs héten kezdődik és a 12. hétre fejeződik be, míg ugyanez a folyamat egérben 5 napot vesz igénybe (Kapur és mtsai., 1992; Fu és mtsai., 2004; Wallace és Burns, 2005; Sanselli és mtsai., 2012). A nyaki eredetű ganglionléc sejtek mellett második forrásként a caudális helyzetű, sacralis velőcsőszakaszokból kilépő sejtek is részt vesznek a bélidegrendszer alkotásában. A sacralis ganglionléc sejtek először a cloaca körüli mesenchymát kolonizálják és a plexus pelvicius ganglionjait képezik, majd caudorostralisán vándorolnak (Nagy és mtsai., 2007). A colorectum az egyetlen olyan része a bélnek, melyet mind vagalis, mind sacralis eredetű ganglionléc sejtek kolonizálnak. A sacralis ganglionléc sejtek neuronális altípusai és szerepe tisztázatlan és egyelőre az sem bizonyított, hogy részt vesznek a humán bélidegrendszer alkotásában. Számos transzkripciós faktor, szignál útvonal és neurotrophicus faktor részt vesz a bélidegrendszer szabályozásában (lásd. később). A bélidegrendszer fejlődése dinamikus folyamat, melyben molekuláris kölcsönhatások finom szabályozása révén a ganglionléc sejtek migrációja, proliferációja és differenciálódása szimultán módon zajlik a bélrendszer különböző szakaszainak megfelelően. Mialatt a vándorló ganglionléc eredetű sejtek legelől haladó ún. első vonalbeli sejtek (wavefront cells) migrációja zajlik, folytatják a proliferációjukat és

fokozatosan belépnek a bél ganglionlécmentes területeire, míg a mögöttük lemaradó sejtek néhány osztódás után glia és neuron irányba differenciálódnak. A bélidegrendszer fejlődése különböző molekuláris markerekkel jól nyomonkövethető. A ganglionléc sejtek bélbe történő belépése előtti azonosítására használható a Sox10 és a Phox2b transzkripciós faktorok kimutatása. Az endothelin receptor B (EdnRB, G protein kapcsolt receptor), a p75 neurotrophicus receptor és az ún. Ret receptor fehérje, (tirozin kináz típusú), a bélső falában vándorló ganglionlécsejtekre jellemző molekula készlet. A vándorlás során caudálisan elhelyezkedő sejtek megkezdik a differenciálódást; előbb a neuron, majd a glia irányba elkötelezett sejtek jelennek meg. A neuron irányba elkötelezett sejtek kezdetben olyan pán-neuron markereket fejeznek ki, mint a béta-III-tubulin, neurofilamentum és a HuC/D (RNS kötő fehérje). A későbbiekben az adott neuron altípusra specifikus neurotransmitter expressziója (NOS, VIP, 5-HT, Substance P) alapján lehet karakterizálni a sejteket. A glia irányba differenciálódó sejtek kezdetben a brain-fatty-acid-binding protein (B-fabp) cytoplazmatikus fehérjét fejezik ki, megtartják a korai ganglionlécsejtekre jellemző sox10 transzkripciós faktor expresszióját és a differenciálódás előrehaladtával fokozatosan megjelenik az érettebb gliára jellemző glial-fibrillary acidic protein (GFAP) intermedier filamentum kifejeződése is.

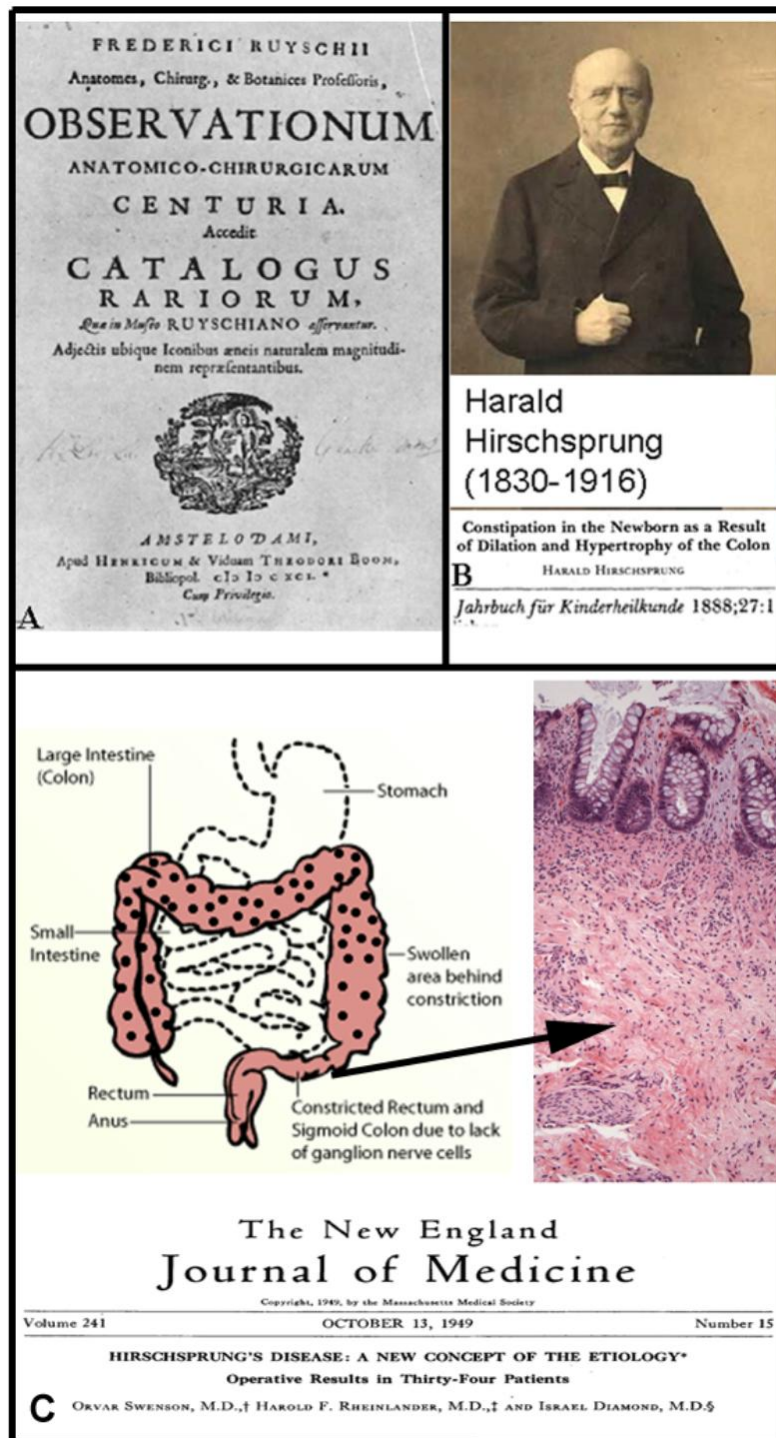
### **2.3. A bélidegrendszert érintő neurocristopathiák; Hirschsprung-kór:**

Ha a bélidegrendszer embryonális fejlődés során a ganglionléc sejtek kolonizációja zavart szenved és a ganglionok hiányoznak a béltraktusból, akkor az aganglionózissal jellemzett Hirschsprung-kór nevű születési rendellenesség jön létre. Ez a veleszületett, elsősorban a vastagbél idegrendszerét érintő elváltozás, emberben 1:5000 arányban fordul elő. A betegséget Harald Hirschsprungról nevezték el, aki dán gyermekgyógyász volt és először írta le ezt a kórképet. Eredeti közleményében két egymástól független esetet közölt, melyben két fiú halt meg hasi disztenzió, kongenitális megacolon és krónikus székrekedés következtében. A tanulmány "Gesellschaft für Kinderheilkunde-Berlin" folyóiratban 1887-ben jelent meg. Tudománytörténeti érdekesség megemlíteni, hogy valójában Frederich Ruysch (holland anatómus) volt, aki először megfigyelte a megacolon jelenségét. Munkája az Observationum Anatomici-chirurgicarum Centuria-ban jelent meg 1691-ben (Eric Leenders, William K. Sieber, 1970). A korai megfigyelések ellenére a megbetegedés etiológiája mégis egészen az 1950-es évekig tisztázatlan volt. 1949-ben a bostoni Harvard Egyetemen sebészként dolgozó Orvar Swenson ismerte fel először, hogy a



3993Hirschsprung-kórt nem a rendellenesen kitágult vastagbél okozza, hanem valójában a születés előtt a megacolon szakasz alatt és a belső analis sphincter felett aganglionális szegment alakult ki, amelynek következtében az érintett bélszakasz tónusos kontrakcióban van; nem képes relaxációra és ebből adódóan a szűkület feletti bélszakasz kitágul (**2. ábra, C kép**) (Swenson és mtsai., 1949; Kapur, 2000; Skaba, 2007). A megbetegedés 75-80%-ban a rectumra és a szigmabélre korlátozódik és csak 8%-ban érinti a teljes bélszakaszt. A legtöbb beteg esetében sporadikus megjelenésről beszélhetünk, de előfordulnak nem-Mendeli, multifaktoriális öröklődést mutató esetek is. A nemek közötti arány 4:1 férfi túlsúlyt mutat. 70%-ban izolált formában jelenik meg, ugyanakkor előfordul egyéb születési rendellenesség részeként is. Például gyakran kapcsolódik a 21-es triszómiához és a IV-es típusú Waardenburg szindrómához. Ugyancsak a bélidegrendszer fejlődési zavara áll a hypoganglionózissal vagy a hyperganglionózissal és ektopikus ganglionok megjelenésével együtt járó neurondiszpláziák esetében is.

A bélidegrendszert érintő megbetegedések fő jellemzője a motilitás zavarában nyilvánulnak meg. Legtöbbször a születés után 48 órán belül diagnosztizálják, ha az újszülött széklet (mekónium) ürítése késik. Legfőbb tünetei a passzázs zavar, tágult has, epés hányás és az enterocolitis (Heanue és Pachnis, 2007). Ha a vastagbélnek csupán egy rövid szakasza érintett, a tünetek enyhék, és esetleg csak késő gyermekkorban diagnosztizálják. Ezeknek a gyermekeknek a széklete szalagszerű, hasa puffadt lehet, gyakran nem gyarapodnak. Néhány esetben az egyetlen tünet a székrekedés. Gyakran adnak báriumos beöntést, ami alapján el lehet dönteni, hogy a spasmus miatt átjárható-e a bél lumene. A betegséget megbízhatóan csupán végbélbiopszival, valamint a végbélben lévő nyomás mérésével lehet diagnosztizálni. Az esetek jelentős részében kezelés nélkül halálos szövődmények alakulhatnak ki, ezek közé tartozik például az enterocolitis, perforáció vagy a malnutritíció. Jelenlegi kezelés az aganglionózisos bélszakasz sebészi eltávolítása, majd ezt követő műtéti anasztomózis (Swenson módszer), néhány esetben nem készítenek egy lépésben anasztomózist, hanem a hasfalon kialakított nyíláshoz csatlakoztatják az egészséges bélszakaszt (Hartmann műtét).



**2. ábra: A Hirschsprung-kór felfedezésének történeti áttekintése. A.)** F. Ruysch's 1691-ben megjelent könyvének első oldala, melyben elsőként került leírásra a congenitális megacolon (Hirschsprung-kór) szindróma. **B.)** Harald Hirschsprung portréja és a megacolonról leíró publikáció fejléce. **C.)** Orvar Swenson 1949-ben ismerte felelőszőr, hogy a Hirschsprung-kór elsődleges hibáját a distális colorectum idegrendszerének hiánya jelenti. A bélperisztaltika az érintett szegmens területén hiányzik, ennek eredménye, hogy itt folyamatos simaizom spasmus és bélobstructio lép fel, a béltartalom pang és a proximálisabb normál beidegzéssel rendelkező szakasz jelentősen kitágul. Swenson végezte el először az aganglionáris bélszakasz eltávolítását, aminek köszönhetően a beteg meggyógyult.

#### **2.4. Hirschsprung-kór hátterében álló molekuláris mechanizmusok:**

A Hirschsprung-kór és az egyéb bélidegrendszeret érintő megbetegedések hátterében bizonyítottan nagy szerepük van azoknak a mesenchymális és epitheliális eredetű növekedési faktoroknak, amelyek az embryonális béltraktusban termelődnek. Egyes tanulmányok szerint a Hirschsprung-kór hátterében közel 50%-ban a bélcső mesenchymájában termelődő glia-eredetű növekedési faktor (GDNF) és a ganglionléc eredetű sejtek felszínén lokalizálódó Ret nevű receptorának, valamint a szintén mesenchymális Endothelin-3 (ET-3) és receptorának (EdnrB) mutációja áll (Henue és Pachnis, 2007; Obermayr és mtsai., 2013). A neurotropikus faktorok családjába tartozó GDNF a sejtmembrán GFRalpha1 receptorához kötődik. A GDNF-GFRalpha1 komplex egy másik molekulát, a RET tyrosine kináz receptort aktiválja. A ganglionléc sejtek előbélbe történő belépését megelőző időszakról kezdve a bél mesenchymája termeli a GDNF-et, míg a ganglionléc sejtek felszínén a RET és a GFRalpha1 fejeződik ki. A mesenchymában termelődő GDNF kemoattraktáns hatást fejt ki úgy, hogy kezdetben a GDNF a gyomor, a coecum és a cloaca területén jelentkezik nagyobb koncentrációban. Ennek az expressziós mintázatnak köszönhetően a bél mesenchymájának kolonizációja koncentráció grádiensek mentén történik, először a leendő gyomor felé vándorolnak a ganglionlécsejtek, majd innen a coecum és a cloaca irányába haladnak. In vitro kísérletekkel is igazolták, hogy kollagén gélbe oldott GDNF hatására a tenyészetbe kihelyezett embryonális béldarabokból a ganglionlécsejtek intenzív kivándorlása történik meg. (Fu és mtsai., 2004; Nagy és Goldstein, 2006a; Mwizerwa és mtsai., 2011). A GDNF-GFRalpha1-RET szignálút vonal esszenciális a ganglionléc sejtek túléléséhez, proliferációjához, migrációjához és differenciálódásához. Az enterális neuronok száma megnő, ha a RET szignál negatív regulátora inaktiválódik vagy növekszik a GDNF elérhetősége.

A Neurturin (NRTN) a GDNF növekedési faktor ligand család másik tagja, ami a GFRA2-höz kötődik, amin keresztül szintén a RET receptort aktiválja. A NRTN mutációját megtalálták Hirschsprung-kórban szenvedő betegeknél, de a mutáció következtében a myentericus neuronok száma nem változik, ellenben az excitátoros idegrostok denzitása jelentősen lecsökkent.

A GDNF ganglionléc sejtekre kifejtett serkentő hatását egy másik mesenchymális eredetű növekedési faktor, az ET-3 és a ganglionléc sejtekben található receptor (EdnrB) jelátviteli komplex modulálja. Az ET-3 gátolja a GDNF kemoattraktáns hatását, fokozza a ganglionléc sejtek proliferációját, illetve lassítja a differenciálódását (Nagy és Goldstein, 2006a; Goldstein és Nagy, 2008). Az EDN3-at a bél mesenchyma expresszálja, legnagyobb mennyiségben itt is a coecum területén, receptorát (EdnrB) a ganglionléc sejtek fejezik ki. A jelátvitel zavara aganglionózist, a kolonizáció sebességének csökkenését, valamint a neuronális differenciálódás hibáját okozza. Ugyancsak ez az útvonal szükséges a melanocyták zavartalan fejlődéséhez. Ez magyarázza a IV-es típusú Waardenburg szindrómában szenvedő betegek fenotípusát, ami egy vastagbelet érintő aganglionózissal járó megbetegedés és a ganglionok hiánya mellett, szenzorieurális süketséggel, valamint pigmentációs abnormalitással is jár. A IV-es Wardenburg szindróma előfordulásának 60-80%-ban az EdnrB és az EDN3 gének mutációja mellett a SOX10 transzkripciós faktor is szerepet játszik.

A bélidegrendszer normális és patológiás fejlődését számos transzkripciós faktor szabályozza. Ide tartozik a SOX10, PHOX2B, PAX3, HOX11L1, HAND2, MASH1 és a ZEB2 molekulák. Mutációjuk Hirschsprung-kór kialakulásához vezetnek. A SOX10, például esszenciális szerepet játszik a bélidegrendszer fejlődésében: szükséges a RET és a PHOX2B molekulák ganglionléc-sejteken történő zavartalan expresszióhoz, ezáltal fenntartja a ganglionléc eredetű sejtek multipotenciáját. SOX10 expressziója a neuron irányba differenciálódó ganglionléc sejtekben fokozatosan lecsökken, csak a glia irányba elkötelezett sejtekben marad meg (McKeown és mtsai., 2013; Lake és Heuckenroth, 2013;). A ganglionléc sejtek molekuláris biológiai és genetikai jellemzése mellett a Hirschsprung-kórban szenvedő pácienseknél genome-wide association analysis-sel további, bélidegrendszer fejlődésében szerepet játszó gén jelentőségét tárta fel. Ezek közé tartozik a NEUREGULIN 1 és 3, PATCHED 1 (**Ptc1; Sonic hedgehog jelátviteli receptora**) és a DELTA-LIKE 3 gének is, melyek in vitro kísérletek alapján a ganglionléc sejtek proliferációját, migrációját és differenciálódását szabályozzák (Wang és mtsai., 2013).

A béltraktus falában található kapilláris hálózat endothel sejtjei is részt vesznek a ganglionlécsejtek vándorlásának irányításában és serkentik az osztódásukat. A ganglionléc sejtek béta-1 integrint expresszálnak a felszínükön, amivel a környező mesenchymális szövetekben található extracelluláris mátrix molekulákhoz, elsősorban az erek basalis membránjában található laminin és fibronectinhez kapcsolódnak (Nagy és mtsai., 2009). A mesenchymában és az endothel sejtek környezetében található fibronectin és laminin

sejtmigrációt stimuláló hatását a bélidegrendszer prekursorai által termelt tenascin modulálja (Akbareian, Nagy és mtsai., 2013).

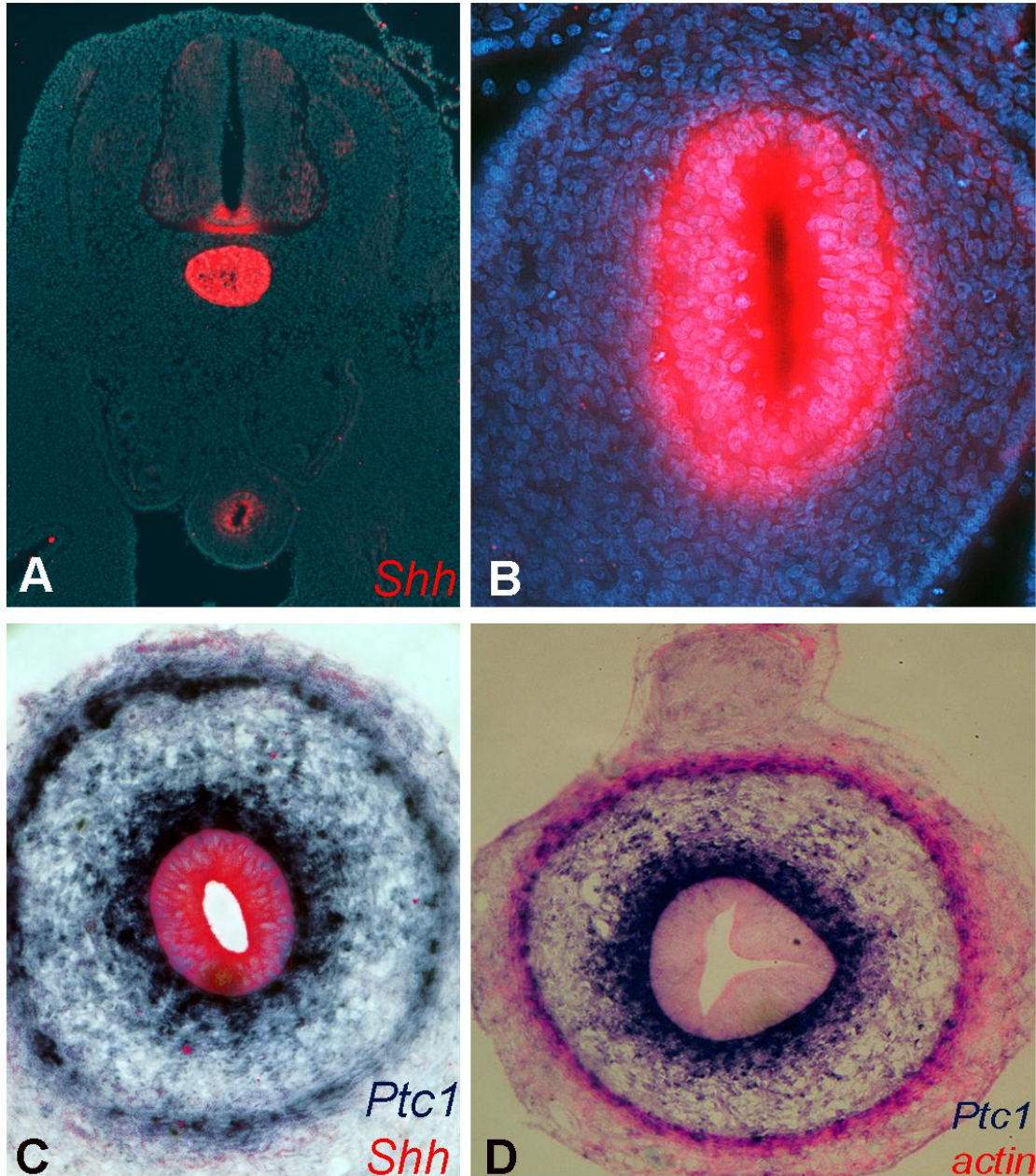
A mesenchymából származó faktorokon kívül ugyanakkor többször is felvetődött a bélepitheliumból származó faktorok szerepe is, úgymint a Netrin, mely kemoattraktáns hatású a ganglionléc sejtekre, valamint a Hedgehog fehérjék részvétele, melyeknek szerepe egyelőre kevésbé tisztázott. A netrinek a szekretált proteinek egy konzervatív családja, amely körülbelül 600 aminosavból áll (Dickson és Keleman, 2002). A négy tagból álló Netrin fehérje család az UNC5 és a DCC (deleted in colorectal cancer) ganglionléc sejteken található receptorokon keresztül fejtik ki sejt-vándorlást szabályozó hatásukat. Az UNC5 receptoron keresztül repulzív hatás érvényesül, ezzel szemben a netrin a DCC receptoron keresztül befolyásolja a sejtek myentericusból a submucosális régióba történő vándorlását (Jiang és mtsai., 2003). Csirke és egér embryokban a bél epitheliuma expresszálja a netrinek (netrin 1 és 3 egérben, netrin 2 csirkében), míg a DCC receptor a vándorló ganglionléc sejteken található (Seaman és mtsai., 2001). In vitro vizsgálatokkal kimutatták, hogy a netrin vándorló ganglionléc sejtekre gyakorolt kemoattraktáns hatása a DCC receptorokon keresztül valósul meg. Ezt igazolja az a tény is, hogy DCC receptor hiányos egereknél nem fejlődtek ki a submucosalis ganglionok (Jiang és mtsai., 2003). Érdekes, hogy bár az epitheliális sejtek expresszálják a netrint a ganglionléc sejtek mégsem a mucosába vándorolnak, hanem a körkörös izomréteg belső oldala mentén ganglionokba rendeződnek. Ez felveti azt a lehetőséget, hogy kell lennie egy eddig ismeretlen gátló mechanizmusnak, ami annak ellenére megakadályozza a sejtek mucosába történő belépését, hogy ott magasabb a netrin koncentráció.

A **hedgehog (Hh) növekedési faktor** családba három morfogén tartozik: a sonic hedgehog (Shh), az indian hedgehog (Ihh), valamint a desert hedgehog (Dhh). Az Shh fehérje az embryonális fejlődés kezdetén a gerincvelő alaplemezában, a gerinchúrban, majd később a végtagbimbókban és a bélcső entodermájában fejeződik ki (**3. ábra A-B kép**). A Shh expresszió kritikus szerepet játszik a végtagok megfelelő antero-posterior mintázatának kialakulásában, a gerinchúr dorsoventrális mintázatának létrejöttében, valamint a bélfal koncentrikus elrendeződésében (Sukegawa és mtsai., 2000). Mutációja esetén leggyakoribb fenotípusok a rendellenes koponya, rövidebb ujjpercek, csigolyák hiánya, nyelőső sipoly és cloaca malformatio.

A bélfejlődés során a hedgehog ligandokat (Shh, Ihh) a bél epitheliuma expresszálja (Ramalho-Santos és mtsai., 2000; Sukegawa és mtsai., 2000; Kolterud és mtsai., 2009). A hedgehog szignálút vonal a hedgehog fehérje célsejten lévő Patched-1 (Ptc1) nevű

receptorához való kötődésével veszi kezdetét. A Ptc1 receptor normál esetben a Smoothened (Smo) nevű transzmembrán receptorhoz kötődik, melynek eredménye egy gátló hatású molekuláris kölcsönhatás. Amint a Hh fehérje bekötődik a Ptc1 receptorához ez a kapcsolat megszakad és a gátlás alól felszabadított, aktív Smo elindít egy szignál transzdukciós kaszkádot. Ennek eredményeként megtörténik a Gli fehérjecsaldába tartozó transzkripciós faktorok sejtmagi transzlokációja. A hedgehog fehérjék a bél mesenchymában termelődő bone morphogenetic protein 4 (BMP4) expresszióját is serkentik. A BMP4 növekedési faktor a submucosalis mesenchymában fejeződik ki, receptorai a bélidegrendszer prekursorain találhatóak, amin keresztül a sejtek osztódását és vándorlását fokozza; negatív szabályozását a mesenchymális sejtekből szekretált antagonistá hatású molekula, a Noggin végzi (Goldstein és mtsai., 2005).

In vitro egér embryon végzett kísérletek alapján Fu és munkatársai (2006) azt feltételezték, hogy a Shh módosítja a ganglionléc sejtek GDNF-el szembeni érzékenységét. A Shh stimulálja a ganglionléc sejtek proliferációját, gátolja a neuronok differenciálódását és megakadályozza a ganglionléc sejtek submucosára eső mesenchymában történő migrációjának a lehetőségét. A Shh célzott mutációjának következtében az enterális neuronok száma megnövekszik és rendezetlenül helyezkednek el (Ramalho-Santos és mtsai., 2000). Az Ihh célzott mutációk hatására a bélszakasz adott szegmense kitágul és aganglionózis jellemzi. Ugyancsak ehhez hasonló fenotípus figyelhető meg a hedgehog útvonalban résztvevő Gli transzkripciós faktort érintő zavarokban is. A Shh és Ihh mutációk okozta eltérő fenotípus egyelőre nem ismert. Ellentmond egymásnak az a két publikáció is, amely egérembryóban az Shh morfogén Ptc1 receptorának bélidegrendszerben történő expresszióját vizsgálta: Fu és mtsai. (2006) szerint a bélcsőben vándorló ganglionléc sejtek Ptc1-et expresszálnak, míg Kolterud és mtsai. (2009) szerint embryonális korban a bélidegrendszer sejtjei nem fejeznek ki Shh receptorokat (Ptc1, Gli). Zebrahal embryokon végzett Shh-t célzó kutatások eredményei további ellentmondásos adatokat közölnek. Reichenbach és mtsai. (2008) szerint a Shh Ptc1 receptora kifejeződik a zebrahal embryo ganglionléc sejtjein; Ptc1 morfolinóval előidézett funkció-vesztéses mutáció esetén nem alakult ki a zebrahal bélidegrendszere.



**3. ábra: A sonic hedgehog növekedési faktor és receptorának (Ptc1) kifejeződése.** **A.)** Shh molekula kifejeződése 5 napos csirke embryo keresztmetszeti képén (piros színnel az Shh-t, míg kék színnel a sejtmagokat jelöltük). **B.)** A bélcsőben a Shh-ot az epithelisejtek termelik. **C.)** 8 napos embryo vastagbél keresztmetszetén Ptc1 kódoló gén (Shh specifikus receptor) kimutatása in situ hybridizációval (kék). A Ptc1 expressziója a Shh+ (piros) hám alatti mesenchymában és a myentericus régióban figyelhető meg. **D.)** Ptc1 (kék) és simaizom aktin (piros) kettős in situ hybridizáció és immunfluoreszcens jelölése a 8 napos embryo vastagbél keresztmetszetén. Ptc1 a hám alatti mesenchymában intenzív expressziót mutat, míg az aktin + simaizom sejtek a leendő tunica muscularis területére lokalizálódnak. (Forrás: **A, B** képek saját felvételek; **C** és **D** képeket témavezetőm bocsájította rendelkezésemre)

## 2.5. A madár embryo, mint kísérleti modell:

Az „optimális” fejlődésbiológiai modellek kiválasztásánál mindig is fontos szempont volt az embryológusok számára a könnyű hozzáférhetőség, fenntarthatóság, gyors fejlődés, manipulálhatóság, a kísérletes beavatkozásokkal szembeni ellenálló képesség. Éppen ezért az embryot célzó kutatásoknak első kritériuma a megfelelő modellállat kiválasztása. Ez legtöbbször az ecetmuslica, fonálféreg, afrikai karmosbéka, zebrahal, csirke vagy az egér közül kerül kiválasztásra és mindegyiknek megvan a maga előnye, ami alkalmassá teszi az adott kérdés megválaszolására. Az utóbbi években egyre nagyobb szerepet kaptak azok a madárembryokon végzett embryomanipulációs és sejtjelölési kísérletek, amelyekben nyomon követhető egy sejt típus eredete, vándorlása, differenciálódása. Nem toxikus festékek, sejt vonal specifikus monoklonális ellenanyagok vagy embryonális kimérák alkalmazása lehetővé tette egy-egy kérdéses sejt vonal sorsának tanulmányozását, sorstérképek készítését. Hybridoma technika alkalmazásával lehetőség nyílt, specifikus monoklonális ellenanyagok előállítására és a differenciálódó sejt típusok fejlődésbiológiai vizsgálatára pl. ganglionléc, izom, endothél, hemopoiotikus sejtek és azok utódsejtjeire (Nagy és mtsai., 2001; Oláh és mtsai., 2002; Gumati és mtsai., 2003, Bodi és mtsai., 2009). Csirke-fürj kimérákkal lehet meghatározni, hogy a csíralemezek sejtjei milyen szervek kialakulásához járulnak hozzá. A fejlődésnek indult szervtelepek intraembryonális transzplantációjával tisztázható az egyes sejt típusok eredete, sorsa. Talán legtöbbet a ganglionléc eredetű őssejteket vizsgálták, de ugyancsak kimérákkal lehetett kísérletesen bebizonyítani a végtagizmok myotom eredetét, a bordák szklerotom eredetét, a hemopoiotikus sejtek intraembryonális eredetét vagy a bursai dendritikus sejtek eredetét (Catala, 1995; Brand-Saberi és Christ, 2000; LeDouarin, 2000; Nagy és mtsai., 2007). Csirke-fürj kimérával mutatták ki először, hogy a bélidegrendszer sejtjei nem *in situ*, az emésztőszerv mesenchymális állományában alakulnak ki, hanem a velőcsőből származnak és bevándorolnak a fejlődő embryonális bélcsőbe ahol ideg és glia sejtekké differenciálódnak (LeDouarin és Teillet, 1973). Habár a klasszikus embryomanipulációs technikáknak köszönhetően a madár embryo fontos szerepet tölt be a fejlődésbiológiai kutatásokban, fejlődésgenetikai vizsgálatok szempontjából mégis jelentős hátrányba szorult. Ennek egyik oka, hogy az emlősök és kétélűek embryoiban kivitelezhető célzott mutációkat, null-mutáns állatokat madarakban nem lehetett előállítani. Az elmúlt években leírt újszerű génmanipulációs módszerek (retrovírus-technika, elektroporáció)



alkalmazásával viszont már madár embryokban is előidézhető célzott funkció-vesztő és funkció-szerző mutáció. Ezek az újítások ismét előtérbe helyezték a madár embryot, mint kísérleti modellt, hiszen az egerekben kivitelezhető transzgenikus technikák nagyon költséges, időigényes módszerek. A null-mutáns egerek többsége embryonálisan lethális, a transzgenikus embryoba pedig mikrosebészetileg nem lehet beavatkozni. A transzgen, madár embryonális sejtekbe, szervtelepekbe juttatásának egyik lehetséges módszere a virális vektorok alkalmazása. Az első megismert és egyben széleskörűen alkalmazott retrovírus, a madarakat fertőző Rous-sarcoma vírusból módosított replikáció-kompetens Rous-asszociált vírus (RCAS). Az RCAS retrovírusokba tetszőleges gének klónozhatók, így ez a módszer jól alkalmazható pl. transzkripciós és növekedési faktorok fejlődésbiológiai funkciójának vizsgálatára (Iba, 2000; Goldstein és mtsai., 2005; Stern, 2005). A fejlődésbiológiai kutatások során génmanipulációs módszereket ötvözve az embryosebészeti technikákkal részletesen vizsgálták ganglionléc sejtek vándorlását, differenciálódását szabályozó fejlődésbiológiai és molekuláris folyamatokat, viszont a fejlődő bélidegrendszert befolyásoló hám-mesenchyma kölcsönhatások szerepére csak kevés adattal rendelkezünk.

### **III. Célkitűzések**

Szakdolgozati munkám célkitűzése volt:

- 1.) A ganglionléc eredetű őssejtek differenciálódásának karakterizálása a csirke embryo vastagbél fejlődése során.
- 2.) A hámeredetű Shh növekedési faktor hatásának vizsgálata a vastagbél idegrendszer fejlődésére és a mesenchymális környezet differenciálódására.

## **IV. Anyagok és módszerek:**

### **4.1. Kísérleti állatok**

Kísérleteink során csirke (GALLUS GALLUS, White Leghorn SPF, Phylaxia Sanophi, Magyarország) embryokat használtunk fel, amelyek korát embryonális napokban fejeztük ki (E). A csirketojásokat laboratóriumunk keltetőgépeiben forgatórácsos inkubáltuk, 38 °C –on, és 90%-os páratartalmú körülmények között. Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának Engedélyével történtek (engedélyszám: 779-000-2005).

### **4.2. A minták szövettani feldolgoása**

A vékony- és vastagbélszakaszok embryoból történő eltávolítását sztereomikroszkóp alatt végeztük, amelyhez különböző, a mikropreparációs technikára alkalmas eszközöket (mikroolló, csipesz, rovartű, embryospatula) használtunk. A kivett bélszakaszokból immuncitokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatok céljából zselatinos-fagyasztott blokkokat készítettünk.

#### **4.2.1. Zselatinos-szacharózos fagyasztott blokk készítése**

A kipreparált szerveket 1 órán keresztül fixáltuk pufferelt 4%-os paraformaldehidben (PFA), ezután foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS, pH 7,2) háromszor 5 percig mostuk. A fixálást követően egy éjszakán keresztül 15%-os szacharóz PBS oldatában 4°C-on inkubáltuk. A beágyazást megelőzően 37°C-on 1 órán keresztül 15% szacharózt (REANAL) és 7,5% zselatint (Fluka, 04055) tartalmazó PBS elegyében inkubáltuk. Ezt követően a szerveket műanyag mérőtálcákba kiöntött zselatinra helyeztük, orientáltuk, majd pár percig várakoztunk, hogy a „zselatinágyhoz” tapadjanak. Ezt követően a még meleg és folyékony zselatinnal egy újabb réteget képezve befedtük a preparátumokat és 4°C-on 10 percig hagytuk, hogy a zselatin megszilárduljon. Az 1x1cm-es méretre vágott zselatinos blokkokat Shandon Cryomatrix-szal (Anatomical Pathology IND., 67690006) a kartonpapírokra rögzítettük. Utolsó lépésként folyékony nitrogénnel -50°C-ra hűtött izopentánban (2-metilbután, Sigma-Aldrich, M32631) körülbelül 1 perc alatt lefagyasztottuk és a metszetek készítéséig -80°C-on tároltuk.

#### 4.2.2. Beágyazáshoz használt oldatok

1 liter PBS összetétele: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,42g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x2H<sub>2</sub>O, 0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, desztillált víz.

Szacharóz-zselatin tartalmú PBS puffer: 15mg D-szacharózt feloldottunk 100ml PBS-ben, majd az oldatot 4°C-on hűtőben tároltuk. A szacharózt (15m/V%), és zselatint (7,5m/V%) tartalmazó PBS puffert fagyasztva tároltuk -20°C-on.

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

### 4.3. Fagyasztott metszetek készítése

A zselatinos blokkokat Shadon gyártmányú kriotómmal -24C°-os munkahőmérsékleten metsztük le. Metszés előtt a -80C°-os hűtőből kivett blokkot a kriosztátba helyeztük, hogy átvegye annak hőmérsékletét. 11-13µm-es metszeteket poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezre vettük fel és a felhasználásig -20C°-on tároltuk.

### 4.4. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia

#### 4.4.1. Immunhisztokémia

A fagyasztott metszeteket 10 percig PBS-ben rehidráltuk, szobahőmérsékleten. A zselatinos metszetekről a zselatin kioldását 37C°-ra felmelegített PBS-ben végeztük (3-5 perc), majd a PBS-t szobahőmérsékletűre cserélve tovább rehidráltuk. Ezt követően a primer ellenanyagokat [1.táblázat] (50-80µl/metszet) ráértük a metszetekekre. A festések során alkalmazott ellenanyagok a laborunkban felszaporított hybridómák hígítatlan felülúszója, vagy előzetesen betitrált hígítású ellenanyagok voltak. A hígítást 1%-os BSA-t és Na-azidot tartalmazó PBS-ben (PBS-BSA) végeztük. Ezután a metszeteket

szobahőmérsékleten, nedves kamrában 45 percig inkubáltuk, majd 3X5 percen át PBS-ben mostuk.

A következő lépésben szekunder ellenanyagot [2.táblázat] mértünk a metszetekre és további 45 percig szobahőmérsékleten és nedves kamrában inkubáltuk. PBS-ben történő (3x5 perc) mosás után, a szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolása céljából a metszeteket 10 percre PBS-el 3%-ra hígított H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ba (Sigma-Aldrich, H1009) helyeztük, amit ismét PBS-ben történő mosás (3x5 perc) követett. A mosás után ABC komplexet (avidin-biotin-peroxidáz komplex, Vectaststain Elite PK-6100; Vector Laboratories) vittünk fel a metszetekre és fél órán át inkubáltuk. Az ABC oldatot az előírásoknak megfelelő paraméterek szerint hígítottuk (1:100 arányban, PBS-ben). Elsőként PBS-be kimértük az avidin oldatot, majd a biotinilált peroxidázt tartalmazó oldat megfelelő mennyiségét adtuk hozzá, ezután alaposan felkevertük, majd fél óra elteltével felhasználtuk. 3x5 perc PBS-ben történő mosás után a kötődött peroxidáz enzim aktivitását 4-chloro-1-naftollal detektáltuk (Sigma; C8890). A kloronaftolt előzetesen PBS-ben oldottuk (100µl 4-chloro-1-naftol törzsoldat 100ml PBS-ben oldva), majd 300µl 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot adtunk hozzá, amelyet előzőleg sötétben mágneses keverőn legalább fél órát keverttünk. Felhasználás előtt szűrőpapíron átszűrtük és ebben az oldatban a metszeteket sötét helyen 30 percig inkubáltuk. A színreakció előhívása után 3X5 perces PBS mosás következett, majd vízdékony fedőanyaggal (Poly-Aqua Polyscience Inc., Warrington PA, USA; 18606) lefedtük a metszeteket.

#### 4.4.1.1. „Whole mount” immunfestés:

Néhány esetben a mikroszkópos vizsgálatokat nem metszeteken, hanem teljes béldarabokon végeztük. Ennek során a következőképpen jártunk el: A kipreparált béltraktust 3x5 percig PBS-ben mostuk, majd ezt követően a primer ellenanyagból körülbelül 300µl-t mértünk rá oly módon, hogy az teljesen ellepje a béldarabot. 1 órás rázógépen történő inkubálást követően 4x10 percig ismételtén PBS-ben mostuk. A peroxidázzal jelzett anti-egér IgG szekunder ellenanyaggal szintén 1 órát inkubáltuk, melyet 4x5 perc PBS-ben történő mosás követett. Utolsó lépésként diamino-benzidin (DAB-Sigma) kromogén segítségével tettük láthatóvá az immunreakciót.

#### 4.4.2. Immunfluoreszcencia

##### 4.4.2.1. *Egyszeres immunfluoreszcens festés*

A metszetek előkészítését, primer ellenanyaggal való inkubálását az immunhisztokémiai fejezetben leírtakkal azonos módon végeztük. A következő lépésben szekunder ellenanyagot (50-80µl/ metszet) mértünk a metszetekre. Ez lehetett közvetlenül fluorokrómmal konjugált [3. táblázat] vagy biotinnal konjugált antitest. Az inkubálást szobahőmérsékleten, fénytől védett, nedves kamrában, 45 percen keresztül végeztük. A biotinilált szekunder ellenanyagok bekötődésének detektálására streptavidinnel konjugált fluorókrómot (Invitrogen, Molecular Probes Streptavidin Alexa-Fluor 594 cat.No.: S11227 és Molecular Probes Streptavidin Alexa-Fluor 488 cat.No.: S32354) alkalmaztunk 1:100 PBS-ben hígítva, amely ismételt 45 perces, fénytől védett inkubálást igényelt. A különböző lépések között és az inkubálások után PBS-sel mostuk a metszeteket (3x5 perc).

A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6 diamino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, D1306) reagenst használtunk, melyet PBS-ben hígítottunk 1µg/ml arányban. A Dapi oldatot a PBS-ben történő mosást megelőzően mértük rá a metszetekre és 15 percig hagytuk a metszeteken, ezután lefedtük őket és a továbbiakban, sötétben, 4C<sup>o</sup>-on inkubáltuk.

##### 4.4.2.2. *Kettős immunfluoreszcens festés*

A kettős immunfestés első lépésében a metszetekre ráértük az első primer ellenanyagot, melyet a előzőekben részletezett módon 45 percig inkubáltunk. A PBS-ben történő mosást követően közvetlenül fluorokrómmal jelölt szekunder ellenanyagot [3.táblázat] vittünk fel a metszetekre, mely a primer ellenanyagnak megfelelően izotípus specifikus volt. Az immunfestést a fluorokróm fényérzékenysége miatt fénytől védetten végeztük. 45 perces, nedves kamrában történő inkubálást követően PBS-mosást végeztünk (3x5 perc). Ezután a metszetekre ráértük a második primer ellenanyagot, amit szintén 45 percig inkubáltuk majd 3x5 percig PBS-ben mostuk. A második szekunder ellenanyagot (mely a második primer ellenanyagra faj és izutípus specifikus volt) úgy választottuk meg, hogy a vele konjugált fluorokróm színe eltérjen az első körben használt szekunder ellenanyag színétől. A metszetekre való felvitelt 45 perces inkubáció követett. A sejtmagok kimutatását ebben az esetben is DAPI-val végeztük. A mosás után (PBS) a tárgylemezeket vízdékony fedőanyaggal lefedtük és hűtőben 4C<sup>o</sup>-on tároltuk.

#### 4.5. Az immunfestés során felhasznált primer és secunder ellenanyagok táblázatos összefoglalása

**1. táblázat:** Az immunfestés során felhasznált primer ellenanyagok (klón neve, ellenanyag izotípusa, felismert molekula, detektálható sejtek és a beszerzés forrása).

<b>Primer ellenanyag (klón)</b>	<b>Felismert sejtípusok</b>	<b>Beszerzés /Forgalmazó</b>	<b>forrása</b>	<b>Izotípus</b>
CD57/HNK-1	ganglionléc marker	NeoMarkers		egér IgM
p75	ganglionléc marker	Dr. Louis Reichardt szívességéből(USA)		poliklonális nyúl
Hu (16A11)	neuron marker	NeoMarkers		egér IgG2a
Tuj-1 (B1195)	neuron marker	Covance		egér IgG2a
Bfabp	Glia marker	Dr. Thomas Müller szívességéből (Németország)		poliklonális nyúl
GFAP	Glia marker	DAKO		poliklonális nyúl
Neurofilament (4H6)	Neuron marker	DSHB		egér IgG1
alpha-smooth muscle actin (1A4)	Simaizom marker	DAKO		egér IgG2a
Sox10	Ganglionléc marker	Dr Michael Wegner szívességéből (Németország)		egér IgG1
BrdU (G3G4)	osztódó sejtek	DSHB		egér IgG1
N-cadherin (6B3)	Ganglionléc marker	DSHB		egér IgG1
Kollagén I (I-8H5)	extracelluláris mátrix	ICN		egér IgG1
Versican (core)	extracelluláris mátrix	Dr. Steve Hoffman, Medical University of South Carolina),		poliklonális nyúl

proteins in the V0 and V2 isoforms of versican)		szívességéből	
Fibronectin (B3/D6)	extracelluláris mátrix	DSHB	egér IgG2a
Tenascin (MI-B4)	extracelluláris mátrix	DSHB	egér IgG1
Laminin (31)	extracelluláris mátrix	DSHB	egér IgG1
AMV-3C2	RCAS retrovírus tokfehérje	DSHB	egér IgG1

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

Megnevezés	Forrás	Katalógus szám
lóban készült biotinilált anti-egér IgG (H+L)	Vector Laboratories	BA-2000
kecskében készült biotinilált anti-nyúl IgG (H+L)	Vector Laboratories	BA-1000
kecskében készült biotinilált anti-egér IgM ( $\mu$ lánc)	Vector Laboratories	BA-2020
kecskében készült peroxidáz kapcsolt anti-egér IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2005

**3. táblázat:** Fluorokrómmal konjugált szekunder antitestek: (Invitrogen-Life Technologies), melyek kecskében készültek. A táblázat tartalmazza a faj és izotípus specifitást, a fluoreszcencia csúcsintenzitást és a katalógus számot. Hígítás: 1:100 PBS-ben

szekunder antitest	flouorkrómok excitációs hullámhossza	
	488	594
anti-egér IgG (H+L)	A-11001	A-11005
anti-egér IgG1 ( $\gamma$ 1)	A-21121	A-21125
anti-egér IgG2b ( $\gamma$ 2b)	A-21141	A-21145
anti-egér IgM ( $\mu$ lánc)	A-21042	A-21044
anti-nyúl IgG (H+L)	A-11008	A-11012

#### 4.6. Felhasznált oldatok, előhívószerek

##### Kloronaftol törzsoldat készítése:

A törzsoldat készítéséhez 500 mg 4-chloro-1-naphtol (Sigma, C8890) oldottunk fel 2 ml abszolút etanolban (Molar Chemicals Kft, 02910-101-340) majd -20°C-on tároltuk. Előhíváskor a törzsoldatból készítettünk hígítást, oly módon, hogy a végkoncentráció 25mg/100 ml PBS legyen.

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

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

##### Diamino-benzidin (DAB) készítése:

500 $\mu$ l törzsoldatot (500mg DAB+10mlPBS) sötétben kevertetve feloldottunk 50ml PBS-ben. Ezt követően az oldatot leszűrtük, majd 250 $\mu$ l 3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -t adtunk hozzá.

#### 4.7. Sejtosztódás kimutatása bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine: BrdU) jelöléssel

A bromodeoxyuridin (BrdU)-t a proliferáló sejtek detektálására használják. A bromodeoxyuridin beépül az osztódó sejtek újonnan szintetizálódó DNS-ébe. A beépülő BrdU-t specifikus antitestekkel tudjuk kimutatni. A PFA fixálás előtt az embrionális szerveket 3óráig BrdU oldatban inkubáltuk 37°C-on. 3x5 perces PBS mosás után PFA-ban



fixáltuk és zselatinos blokkokba fagyasztottuk. A fagyasztott metszetekre a PBS-es rehidrálás és zselatinos kioldás után 1N/2N HCl-ot mértünk a lemezekre és 30 percen át 37°C-on inkubáltuk. A következő lépésben a metszeteket 2x5 percig borát pufferben, majd 2x5percig PBS-ben mostuk, ezzel semlegesítve a sósavas hatást. A fluoreszcens jelölt BrdU elleni antitest (1:10 arányban hígítva) rámerése után a metszeteket sötét helyen 45 percig inkubáltuk. Az utolsó 3X5 perces PBS-ben történő mosást követően vízdékony fedőanyaggal (Poly-Aqua Polyscience Inc., Warrington PA, USA; 18606) lefedtük a metszeteket, melyeket ezután 4C°-on hűtőben tároltunk.

#### **4.8. Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás**

A metszeteket Zeiss Axiophot mikroszkóppal értékeltük, és a hozzátalakoztatott kamerával (Zeiss AxioCam HCR) különböző nagyításokon digitális képeket készítettünk. A képek későbbi tanulmányozását, szerkesztését Adobe Photoshop CS 7.01 típusú programmal végeztük.

#### **4.9. Embryomanipuláció**

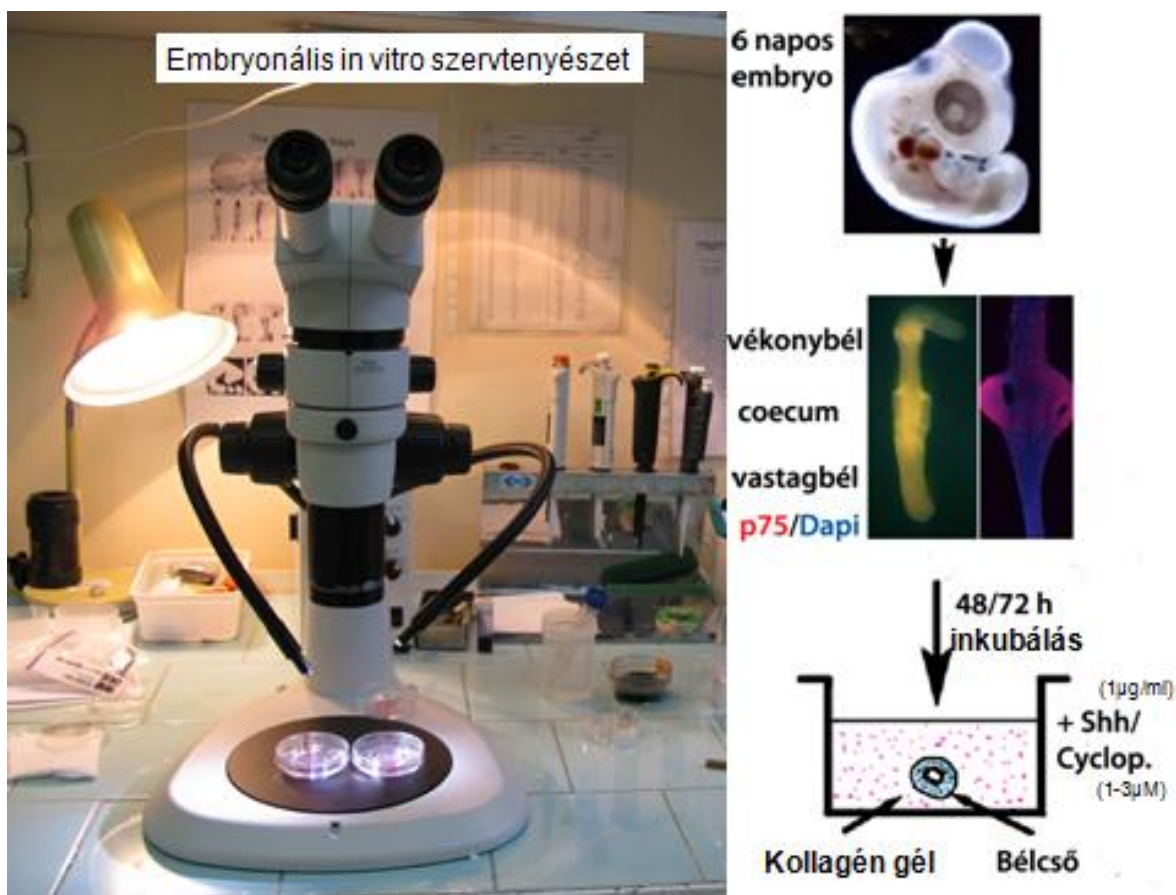
##### 4.9.1. Embryotenyészet

Kísérleteink során a 6 napos embryokból izolált középbelet és utóbelet tartalmazó bélszakaszt I-es típusú kollagén alapú mátrixba ágyazva 48 óráig tenyésztettük. A tenyésztést erre alkalmas tenyésztőedényekben végeztük. (Falcon 353037 Center-Well Organ Culture Dish). A tenyésztő tálca közepébe kollagén mátrixot, míg a műanyag fallal leválasztott külső részbe penicillines - streptomycines PBS oldatot töltöttünk. Az embryokat a belső kör kollagén mátrixának két rétege közé ágyasztuk és 24-48 órát 37°C-on, sejttenyésztő CO<sub>2</sub> inkubátorban inkubáltuk.

##### 4.9.1.1. *A kollagén mátrix elkészítése*

Első lépésben egy eppendorfba összemértünk 700µl DMEM (tenyésztő tápoldat, Sigma), 6µl 1N NaOH, 294 µl kollagén (rat tail 3,38%); /Kevergetve (szívogatással pipettával, hidegen!)/, majd ebből a tenyésztőedény középső részébe belemértünk 350µl-t. 5 perc szobahőmérsékleten történő tárolást követően, 5–10 percre CO<sub>2</sub> inkubátorba (a

polimerizálódáshoz) helyeztük. Azután az edényeket kivettük az inkubátorból és a preparátumokat ráhelyeztük a gél felszínén. Újabb 10 perces CO<sub>2</sub> inkubálást követően a frissen elkészített gélből 350µl-et betakartuk a béldarabokat, ügyelve arra, hogy ne ússzanak fel! 48 óráig tenyésztettük. A kollagénbe oldva a Shh (R&D Systems, Recombinant mouse Shh, cat no.: 461-SH-025) (1µg/ml) növekedési faktor és inhibitorának a cyclopamine-nak (Toronto Research Chemicals Inc.) (1-3µM) valamint a mesenchymális eredetű GDNF-nek (R&D Systems, Recombinant Human GDNF, cat. no.: 212-GD-010) (10-20µM) a hatását vizsgáltuk (4. ábra).



**4. ábra:** Az embrionális in vitro szervtenyészet elkészítésének lépései.

#### 4.9.1.2. *Chorioallantois membrántenyésztés (CAM)*

A CAM módszer alkalmas arra, hogy az embrionális szerveket hosszabb ideig in vivo körülményekhez hasonló miliőben tenyészthessük. A kísérlet során a 6 napos embryokból izolált, 2 napig kollagén mátrixban tenyésztett bélszakaszokat (lásd. 4.9.1.1 fejezetben leírt kísérlet) vagy a RCAS-Shh retrovírus illetve cyclopamine-nel mikroinjektált frissen kiperarált vastagbélbélszakaszokat 8 napos csirke embryo chorioallantois membránjára (CAM) transzplantáltuk a következők lépések szerint:

A tojás héját a légkamra fölött csipesszel eltávolítottuk, a héjhártyára pipettával egy-két csepp penicillines-streptomycines PBS oldatot cseppentettünk, majd óvatosan csipesszel megkarcoltuk, ennek hatására az oldat szétterült a héjhártya alatt és így könnyedén leválaszthatóvá vált. Ekkor feltárult a chorioallantois membrán gazdagon vaszkularizált rétege. Egy nagyobb, Y alakú érágazás kiválasztása után, papírtörítő segítségével felszakítottuk az apróbb kapillárisokat, majd erre a területre helyeztük a graftokat. A felesleges folyadékot felitattuk, majd átlátszó ragasztószalaggal lefedtük a tojáshéjon keletkezett nyílást. Megfelelő jelöléssel ellátva a madártojásokat további 7 napig laboratóriumunk keltetőgépében, forgatórácsos inkubátorban 38°C-on, 90%-os páratartalmú körülmények között.

#### 4.9.2. Shh-RCAS retrovírus és cyclopamine mikroinjektálása

A kísérlet során Narishige márkájú mikroinjektorhoz rögzített 100µl-es Hamilton fecskendő segítségével, vékony üvegapillárisal, a 6 napos embriók vastagbelébe 2-5µl Shh-RCAS retrovírus szuszpenziót vagy Cyclopamine-t (3µM) injektáltunk. Az injektálás előtt PBS 0,1%-os Fast Green oldatát adtuk az injektálásra előkészített oldatokhoz. Ezt követően a bélszakaszokat 8 napos embriók CAM-jára transzplantálva további 7 napon keresztül tenyésztettük.

A retrovírusok segítségével madár embriókban is előidézhető célzott funkció-nyerő és funkció-vesztő mutáció. Erre alkalmasak az olyan virális vektorok, amelyek madarakat megfertőző Rous-sarcoma vírusból módosított, replikáció-kompetens vírusokból (RCAS) készítenek. Az RCAS-okban az RNS a genetikai anyag és ezt egy reverz transzkriptáz, fordítja vissza DNS-re. Az RCAS vírusokba tetszőleges gének klónozhatóak önállóan vagy akár egy markergénnel együtt. A vírus embrióba történő injektálása után az osztódó sejteket fertőzik meg, ahol a retrovírus beépül az újonnan keletkezett sejtek genomjába. Kísérleteinkhez a laborban előzetesen előállított, Shh-t tartalmazó, Shh-RCAS vírust használtuk.

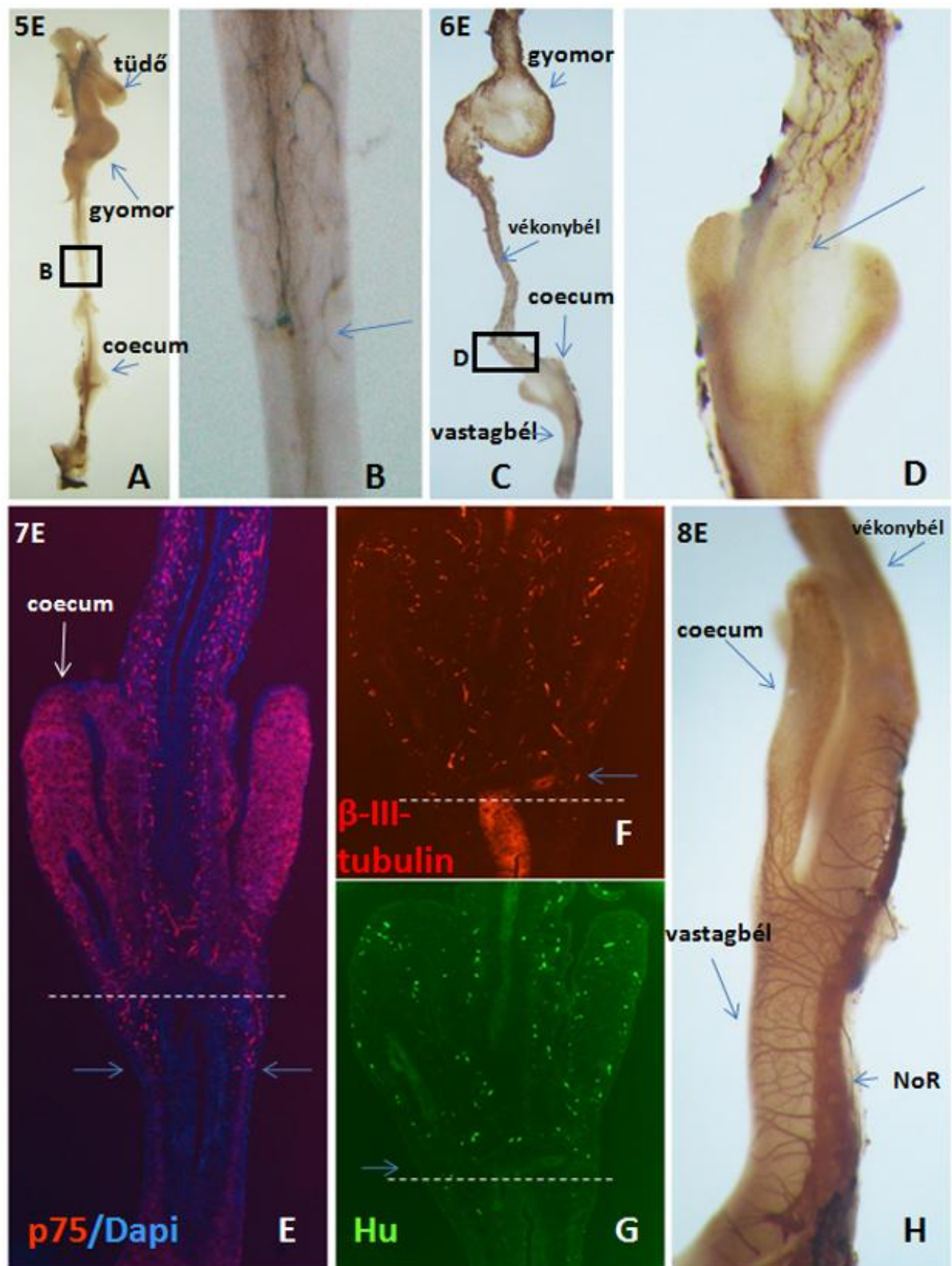
## V. Eredmények:

### 5.1. A vastagbél idegrendszer kialakulása csirke embryóban.

Kísérleteink során első lépésben 5-9 napos csirke embryók fejlődő bélidegrendszerének immuncitokémiai karakterizálását végeztük el. Elsősorban olyan markereket teszteltünk, amelyek az emlős embryóban, beleértve a humán embryót is, a ganglionléc, neuron és a glia sejteket jelölik. Kezdetben metszés nélküli (wholemout immuncytochemistry) immuncytokémiával próbáltuk nyomonkövetni a ganglionléc sejtek bélfalban történő vándorlását és glia, valamint neuron irányú differenciálódását.

5 napos (5E) csirke embryo teljes bélszakaszán végzett HNK1 (ganglionléc marker) és Tuj1 (béta-III-tubulin, legkorábbi neuron marker) wholemount immunfestéssel próbáltuk láthatóvá tenni a vándorló ganglionléc sejteket. A Tuj1 ellenanyaggal szemben a HNK1 monoklonális ellenanyag mindig intenzív mesenchymális háttérfestést adott. Ebben a stádiumban a ganglionléc eredetű Tuj1+ neuronok az előbelet elhagyva a középbélbe lépve találhatóak **(5. ábra, A, B kép)**. A Tuj1+ nervus vagus praeganglionáris rostjai csak a duodenum magasságáig futnak. A Remak-ganglion (madarakra jellemző vegetatív ganglion, ami a bél extrinsic autonóm beidegzéséhez járul hozzá) is intenzíven jelölődik a korai neuronokra specifikus markerrel. A 6 napos csirke embryóban ugyanezzel a technikával csak a béta-III-tubulin whole mount immuncytokémiiai festését végeztük el, ahol a vándorló sejtek első sora a vékony és vastagbél határán található coecumnál figyelhető meg **(5. ábra, C, D kép)**. 7 napos embryóban a vastagbél mérete már kétszerese az 5 naposénak. Talán ez a magyarázata, hogy a Tuj1 whole mount festés a HNK1 ellenanyaghoz hasonlóan nagyon háttéresnek bizonyult. Ezért ettől a stádiumtól kezdve hosszanti metszetek sorozatain vizsgáltuk a ganglionlécsejtek migrációját, differenciálódását.

Csirke és patkány embryókban a ganglionléc eredetű sejtjeinek széleskörben használt markere a HNK1 (CD57) molekulát felismerő ellenanyag. Mivel ez a monoklonális ellenanyag 6 és 7 napos embryóban a ganglionléc sejtekkel együtt a mesenchyma sejteket is jelöli, ezért nem alkalmas a mesenchyma és a vándorló ganglionléc sejtek egymástól való elkülönítésére (Nagy és mtsai. 2012).

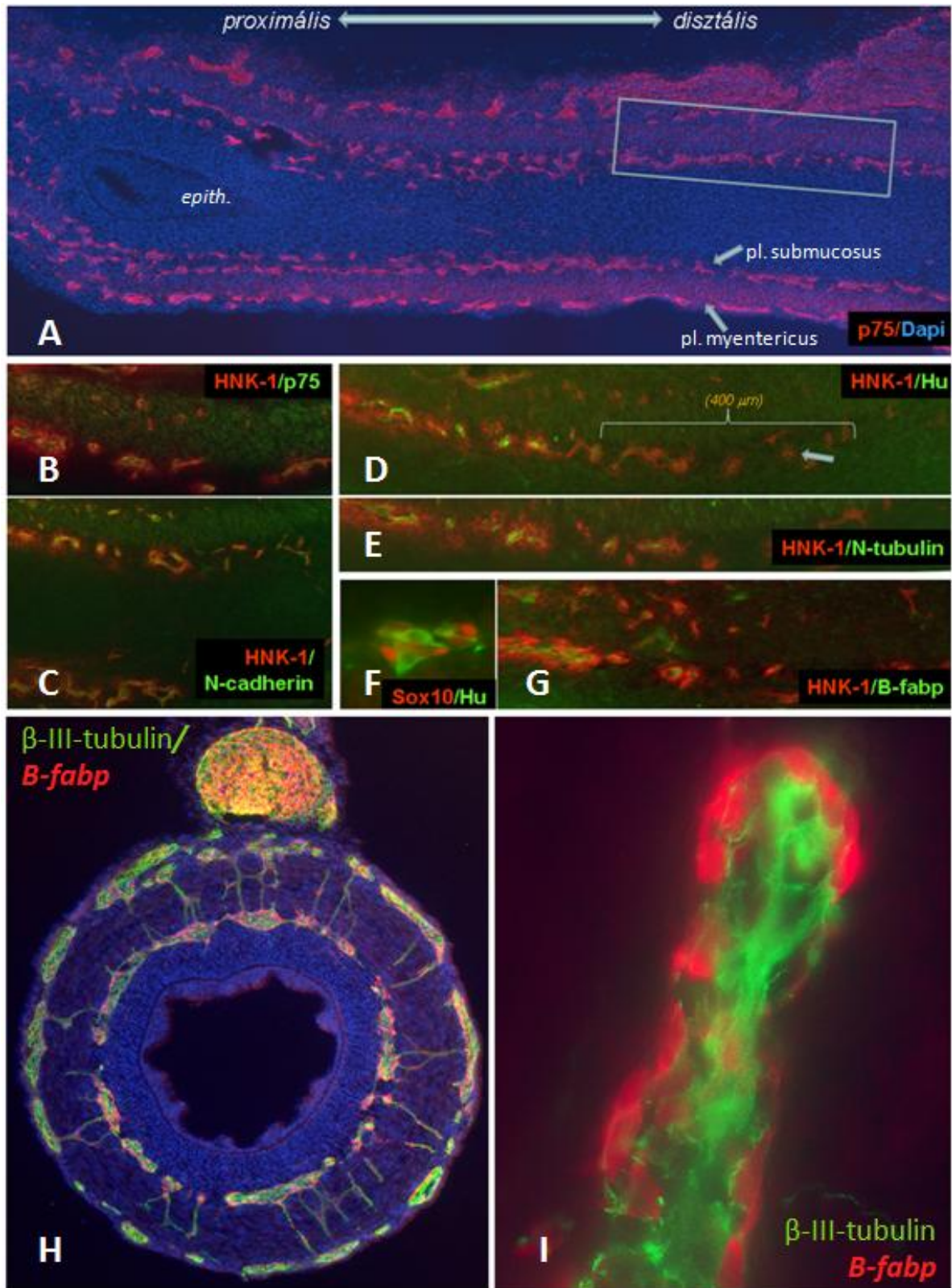


5. ábra: 5 napos (A,B) és 6 napos (C,D) csirke embryok béltraktusának béta-III-tubulinnal (Tuj1) végzett "wholemount" immuncytokémia festése a vándorló ganglionléc eredetű sejtek béltraktusban történő, cranio-caudális irányú előrehaladását mutatja ki. 5 napos korban a sejtek a gyomor és a vékonybél preumblicalis szakaszát népesítették be, míg 24 órával később a vándorló sejtek elől haladó, ún. frontvonal a vékony és vastagbél határán lokalizálódó coecumot is elérte. **B.)** és **D.)** képek az elől haladó

ganglionléc sejtek hálózatát mutatják. **E.) F.) G.):** 7 napos csirke embryo középbelének és vastagbelének longitudinális sorozatmetszetei. **E.)** A vándorló ganglionléc sejteket p75 (piros) jelöli. A p75+ ganglionléc sejtek proximális vastagbél szakaszt kolonizálják (nyíl). Míg a béta-III-tubulin (**F**) és Hu (**G**) neuron markerrel festett sorozatmetszeteken a legelől haladó p75+ ganglionléc sejtekhez viszonyítva proximálisabban csak a coecum telepének magasságában mutathatók ki. A kék szín a Dapi festéssel jelölt sejtmagokat jelöli. **H.)** 8 napos csirke embryon végzett béta-III-tubulin (Tuj1) specifikus „whole mount” immunfestés. A Tuj1 a vastagbélidegrendszer alkotó teljes ideghálózatot festi. A dorsalis helyzetű Remak-féle ganglion (NoR) intenzív Tuj1 pozitivitást ad.

A vándorló ganglionléc sejtek kimutatása során az emlősökben leírt korai ganglionléc markerekkel végeztünk összehasonlító immunfluoreszcens festéseket. A neurotrophin receptorként ismert p75 fehérjét kimutató marker csirke embryóban is kirajzolja a vándorló ganglionléc sejtek csoportját, amelyek ekkor már a vastagbél proximális szakaszát is benépesítik (**5. ábra, E kép**). Párhuzamos sorozatmetszetek neuron specifikus markerrel (béta-III-tubulint jelölő Tuj1 és neuron specifikus RNS kötő fehérjét felismerő Hu elnevezésű ellenanyag) végzett immunfluoreszcens festései azt mutatják, hogy a korai neuronok differenciálódás a legelől haladó (wavefront cells) p75+ ganglionlécsejtek mögött már kezdetét veszi (**5. ábra, F, G kép**).

Kettős immunfluoreszcens festéssel igazoltuk, hogy a p75 mellett az N-cadherin specifikus ellenanyag is kolokalizál a HNK1 markerrel. Összefoglalva, az első HNK-1+/p75+/N-cadherin+ ganglionléc eredetű sejtek a 6. embryonális napon érik el a középbel és utóbél határán található coecum telepét, majd fokozatosan distalis irányba, a cloaca felé vándorolnak. A 7. embryonális napon a ganglionlécsejtek az utóbél középső szakaszát kolonizálják, ahol a myentericus plexus helyén vándorló ganglionléc sejtek némi késéssel követik a submucosalis régióban vándorló sejteket. Ebben a stádiumban az utóbél disztális szakasza felé haladó ganglionlécsejtek között Tuj1 és anti-Hu markerekkel a korai neuronokat, míg a Bfabp-specifikus ellenanyaggal (brain-fatty acid binding protein) a korai glia sejteket azonosítottuk (**6. ábra, A-G kép**). Hu és a Tuj1 festéssel is jól látható, hogy a neurális differenciálódás irányába elkötelezett sejtek frontvonala jóval proximálisabban van, mint a differenciálatlan ganglionléc eredetű sejtekké.



**6. ábra: A ganglionléc sejtek vándorlása és differenciálódása II. A-G.)** 8 napos csirke embryo vastagbél hosszszelvényei. **A.)** A ganglionléc sejteket p75 markerrel (piros) jelöltük, míg a sejtmagokat Dapi-val (kék) festettük meg. **B.)** Az A képen bekeretezett területről készült nagyobb nagyítású felvétel a HNK-1 (piros) és p75 (zöld) ganglionléc markerek kolokalizációját mutatja. **C.)** N-cadherin (zöld) és HNK-1 (piros) kolokalizációja szintén valamennyi ganglionléc sejtet jelöl. **D.)** Hu neuron markerrel (zöld) és ganglionléc

specifikus HNK-1 jelöléssel (piros) a differenciálódó neuronok figyelhetők meg. **E.)** Béta-III-tubulint felismerő Tuj1 neuron marker (zöld) HNK-1 (piros) kettős immunfluoreszcencia szintén a neuronokat jelöli. **F.)** Sox10 (piros) glia marker és Hu neuron specifikus jelölés (zöld) a képződő ganglionban. A képződő ganglionokban jól elkülönülnek egymástól a neuron és glia prekursor sejtek. **G.)** Bfabp+ glia sejtek (zöld) és pirossal jelölt HNK-1+ ganglionléc sejtek. A differenciálatlan Bfabp-/HNK-1+ sejtek 4-500µm-el disztálisabban helyezkednek el, mint a Bfabp+/HNK-1+ gliasejtek. **H.), I.)** 12 napos embryon végzett hármass fluoreszcenciával a glia és a neuron sejtekből álló plexusok (myentericus és submucosalis) ganglionjai mutathatók ki. Béta-III-tubulin+ (Tuj1) neuron marker (zöld); B-fabp+ (piros); Dapi (kék) sejtmag festés. A plexusok ganglionjába szerveződött neuronokat glia sejtek veszik körül.

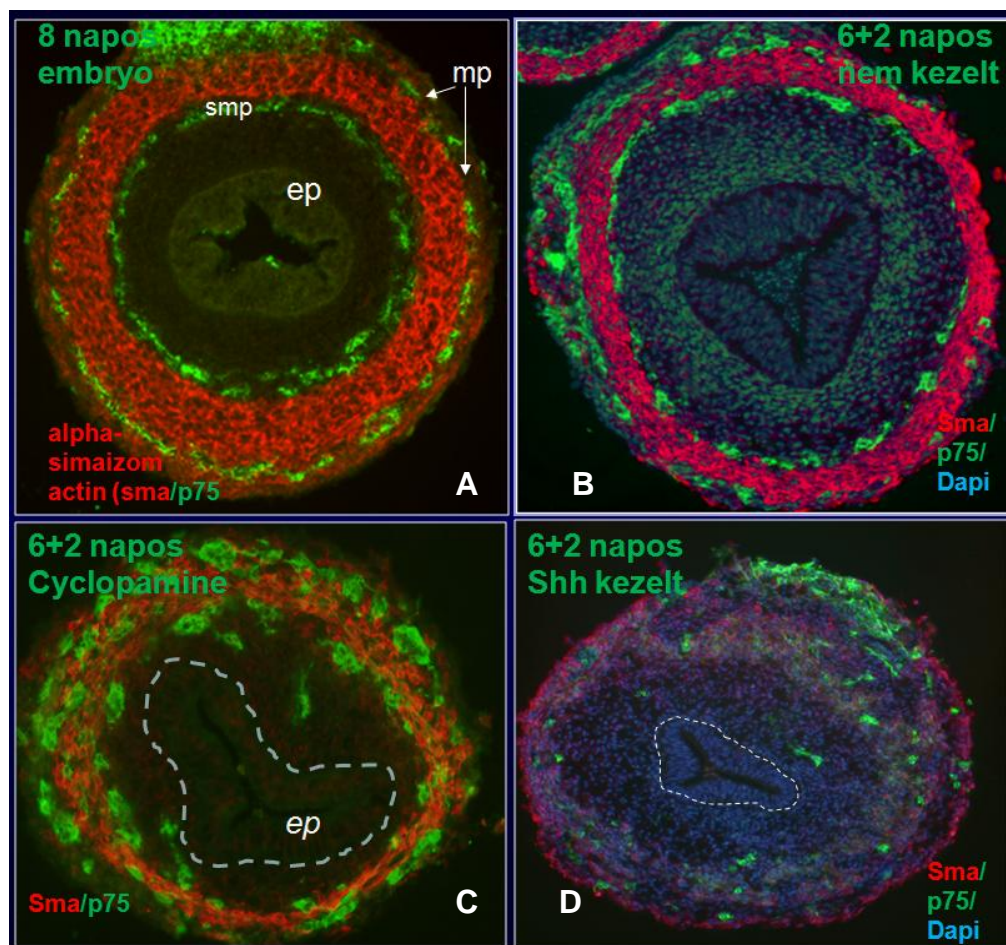
A vándorló ganglionléc sejtek első csoportja és a legelső neuronok, illetve glia sejtek között 4-500 mikrométer távolságot mértünk. Ez azt mutatja, hogy a ganglionléc sejtektől mentes területek kolonizációját differenciálatlan sejtek végzik, míg a béltraktus teljes hosszát tekintve proximálisan elhelyezkedő sejtcsoportokban kezdetét veszi a neuronok és a glia sejtek differenciálódása. A Sox10 transzkripciós faktort jelölő ellenanyag a Bfabp-hez hasonlóan, a korai gliasejteket jelölte (**6. ábra, F kép**), ugyanakkor a neurofilamentumot felismerő ellenanyagok már a differenciálódó neuronokat ismerték fel (nincs kép). A vándorló ganglionlécsejtek a 8. embryonális nap végére az utóbél disztális szakaszát is kolonizálják, és a 12 napos embryóban már jól láthatók a Bfabp+ glia és Tuj1+ neuronok aggregációjából fejlődő ganglionok. Ezek a ganglionok alkotják a körkörös simaizomréteg két oldalán, koncentrikusan elhelyezkedő plexus submucosust és plexus myentericust (**6. ábra, H, I kép**).

## **5.2. A sonic hedgehog jelátvitel hatásának *in vitro* vizsgálata a vastagbél idegrendszer embryonális fejlődése során.**

Szakkolgozati munkám következő részében a fejlődő bélidegrendszer immuncytokémiai karakterizálásából kapott eredményeinket használtuk fel a bélepithelium eredetű Sonic hedgehog növekedési faktor vastagbélidegrendszer fejlődésében betöltött szerepének vizsgálata során. Első kísérletünkben a 6 napos embryokból (vastagbél ganglionlécsejtes kolonizációja előtti stádium) izolált középbelet és utóbelet tartalmazó bélszakaszokat I-es típusú kollagén alapú mátrixba ágyazva 48 óráig tenyésztettük és a kollagénben oldott Shh növekedési faktor és receptor inhibitorának a cyclopamine-nak a hatását vizsgáltuk. A cyclopamine a hedgehog jelátviteli útvonalak specifikus gátlószere, hatását a Patched-1 receptort gátolva fejt ki. A tenyésztés végén a kipreparált béldarabokat



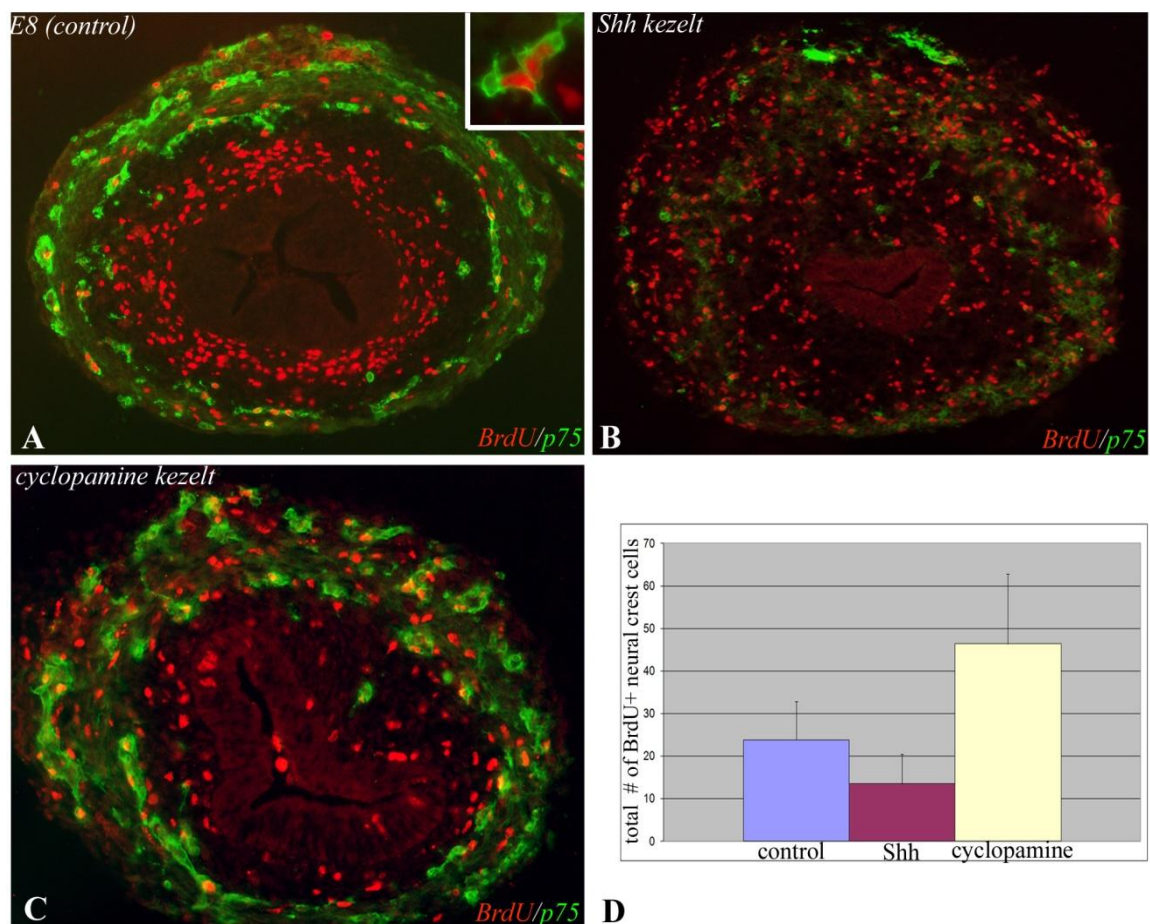
lefixáltuk és szacharóz-zselatinos fagyasztott beágyazás után a coecumtól a cloacaig sorozatmetszést végeztünk, majd kiválasztva minden 8-10. lemezt immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk. Ezzel a módszerrel mindig ugyanazon a bélszakaszokon elvégezhettük a különböző kezelések hisztomorfológiai összehasonlítását. A 48 óráig tenyésztett 6 napos embryoból származó (6+2 napos), nem kezelt (kontroll) vastagbél keresztmetszetén az azonos korú, 8 napos embryonális vastagbél-idegrendszerhez hasonló morfológiát látunk. A p75+ ganglionléc sejtek az alpha-simaizom aktin+ tunica muscularis külső és belső oldalán a leendő plexus myentericus és submucosalis területén csoportosultak (7. ábra, A-B kép).



7. ábra: A Shh és a cyclopamine hatásának *in vitro* vizsgálata a vastagbél idegrendszer embryonális fejlődése során. Piros színnel a simaizom aktint (Sma) expresszáló simaizomsejteket jelöltük, míg zöld színnel a neurotrophin receptorként ismert p75 fehérjére pozitív ganglionléc sejteket mutattuk ki, kék szín a sejtmagokat jelöli. A.) 8 napos embryoból származó vastagbél keresztmetszete. B.) 6+2 napos nem kezelt C.) cyclopamine-nal D.) Shh-al kezelt vastagbél keresztmetszetek. A kontroll (normál embryo, illetve nem kezelt) embryoból származó vastagbél idegrendszere közel azonos morfológiát mutat, míg cyclopamine hatására nagyobb és elszórt ganglionok találhatóak a bél teljes hosszában (C). D.) Shh kezelést követően csak néhány p75+ ganglionléc sejt található elszórtan a mesenchymában.

A 6+2 napos, cyclopamine-nal kezelt vastagbélben a ganglionok mérete jóval nagyobb volt és elszórtan az izomsejtek között lokalizálódtak, illetve gyakran a hám közelébe vándoroltak (**7. ábra, C kép**). Megjegyzem, hogy a cyclopamine-nal kezelt bélnek makroszkóposan vékonyabb volt az átmérője a kontrollhoz képest. A Shh-al kezelt vastagbélben a mesenchyma vastagabb lett a kezelés hatására és a bél radiális szimmetria mentén történő tagozódása (mucosa, submucosa, tunica muscularis) elmosódott. A vastagbélben elszórtan csak egy-egy p75+ ganglionléc sejtet láthatunk (**7. ábra, D kép**). Összefoglalva, a Shh gátolta a két plexus mentén történő ganglion hálózat kialakulást, a simaizom sejtek alacsony alpha-simaizom aktin expressziót mutattak, ami az izomdifferenciálódás zavarát jelzi.

Azon kérdés megválaszolására, hogy a Shh és a cyclopamine kezelés hogyan befolyásolja a vastagbélben található sejtek proliferációját, BrdU kezelést alkalmaztunk. Nem kezelt vastagbélben a submucosalis mesenchyma proliferációja kifejezett, amit a piros fluoreszcenssel jelölt BrdU expressziója jól mutat. Az osztódó mesenchyma sejtek mellett a plexusok ganglionjaiban is nagyszámú osztódó, BrdU+/p75+ osztódó ganglionléc sejtek figyelhetők meg. (**8. ábra, A kép**). A Shh kezelés általánosan stimulálta a bél mesenchyma sejtjeinek proliferációját viszont a ganglionléc sejtek proliferációs képességét csökkentette; elszórtan néhány BrdU+/p75+ kettősen jelölt ganglionléc sejtet azonosítottunk a metszeteken (**8. ábra, B kép**). Ezzel szemben a hedgehog jelátvitel gátlásának hatására (cyclopamine kezelés) a submucosalis mesenchyma sejtjeinek osztódása jelentősen csökkent, de az enterális ganglionok nagyszámú osztódó sejtet tartalmaztak (**8. ábra, C kép**). Ezek a sejtosztódást érintő hatások magyarázhatják azt a korábban említett megfigyelést, miszerint az Shh kezelést követően a tenyésztett vastagbélszakaszok jelentősen megvastagodtak.

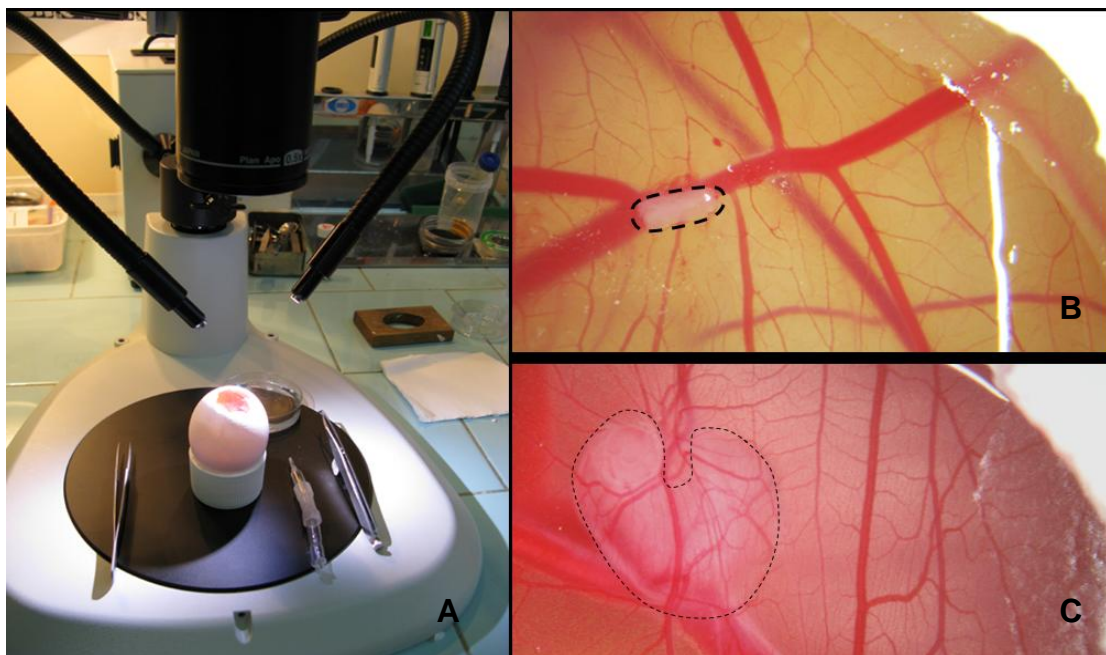


**8. ábra: A Shh és a cyclopamine kezelés sejtproliferációra kifejtett hatása. A.)** 8 napos kontroll embryo keresztmetszete: az osztódó sejtek többsége a tunica submucosa területére esik. **B.)** 6+2 napos Shh kezelt vastagbél keresztmetszete: egyenletesen elszórt, nagyszámú osztódó mesenchyma sejtet mutat. **C.)** 6+2 napos cyclopamine kezelt embryo keresztmetszete: a mesenchyma osztódási mutatója lecsökkent, ugyanakkor jelentő számú proliferáló sejt található a bélidegrendszer ganglionjaiban. Mindhárom kísérlet esetében BrdU jelölést (piros) alkalmaztunk az osztódó sejtek kimutatására, míg a ganglionléc sejteket p75-el (zöld) jelöltük. **D.)** Az eltérő kezelések során megfigyelt p75/ BrdU kettősen pozitív sejtek számának oszlopdiagramon történő ábrázolása.

### 5.3. A Sonic hedgehog jelátvitel hatásának *in vivo* vizsgálata a vastagbél idegrendszer embryonalis fejlődésére.

Mivel a szöveti struktúra szétesése miatt a kollagén gélben nem lehet az embryonalis szerveket 2-3 napnál hosszabb ideig tenyészteni, ezért a Shh-al és a cyclopamine-nal kezelt bélszakaszokat egy másik embryoba ültetve *in vivo* tovább tenyésztettük. A hedgehog jelátvitel *in vivo* tanulmányozására két kísérletet terveztünk. Először az *in vitro* vizsgálatban leírt protokoll szerint jártunk el, azaz a 6 napos csirke

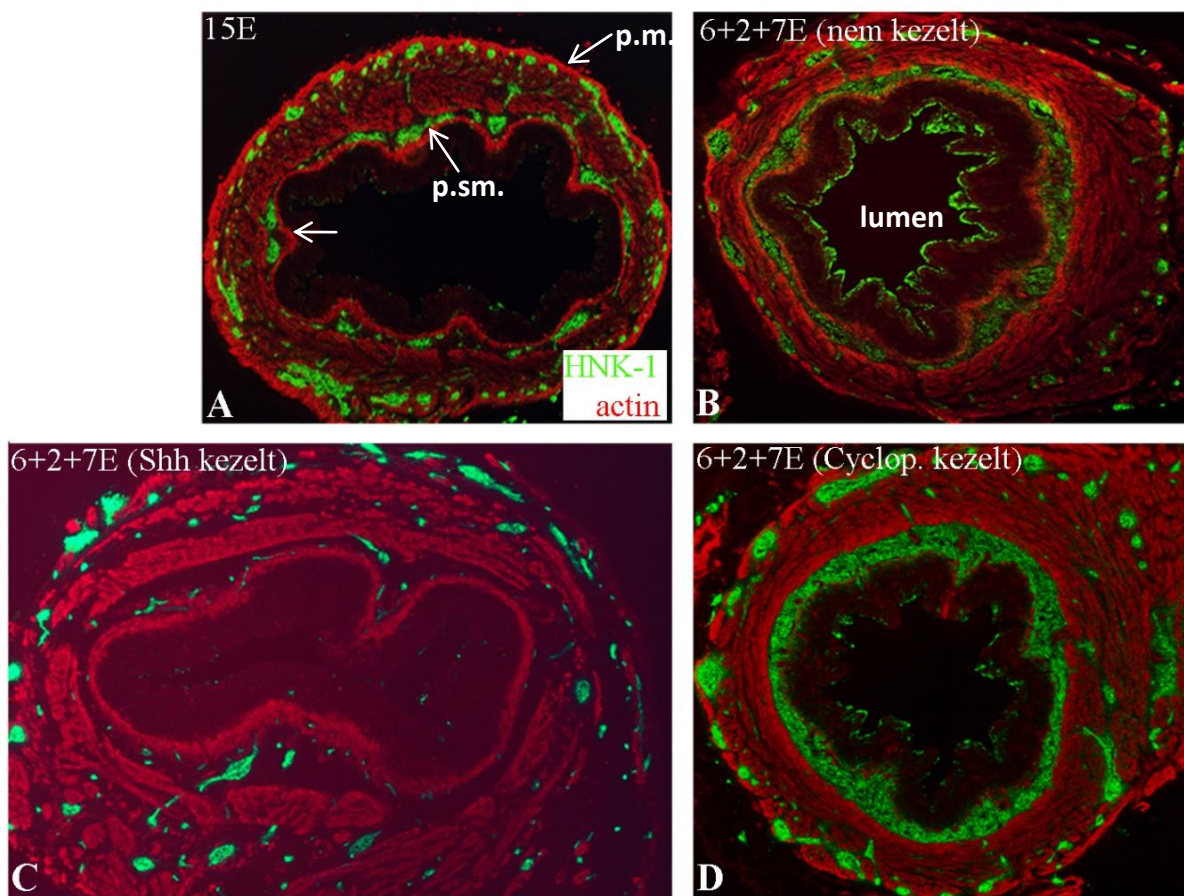
embryokból izolált vékony és vastagbél szakaszokat Shh vagy receptor inhibitorának jelenlétében 48 óráig kollagén gélben tenyésztettük. Itt újból megjegyzem, hogy a 6 napos csirke embryo a HNK-1+/p75+/N-cadherin+ ganglionléc eredetű sejtek a vékony és vastagbél határán, a coecum magasságában található, így a tenyésztés idején a gélben oldott Shh közvetlenül a vastagbél ganglionléc sejt kolonizációjakor érvényesül. A első kísérlet során a tenyésztés után a steril körülmények között izolált vastagbél szakaszokat 8 napos embryo chorioallantois membránjára transzplantáltuk és 7 napig tovább tenyésztettük. Az inkubálás alatt a bél vaszkularizálódik és jelentős méretbeli növekedés is megfigyelhető (**9. ábra**). A vastagbél mérete közel megfelel az azonos korú embryokból preparált vastagbél hosszának és átmérőjének.



**9. ábra: Chorioallantois membránon történő embryonalis szervtenyésztés.** A.) Chorioallantois transzplantációt sztereomikroszkóp alatt végeztük. B.) A tojáshej és a héjhártya felnyitása után a graftokat „Y” alakú érelágazás felületére helyeztük. Előzetesen a kapillárisok mechanikai sértése lehetővé teszi, hogy a graft hatékonyabban vaszkularizálódjon. Az érelágazásra kiültetett graft a kísérlet elején, illetve a vaszkularizálódott graft makroszkópos képe 7 nappal a transzplantációt követően (C).

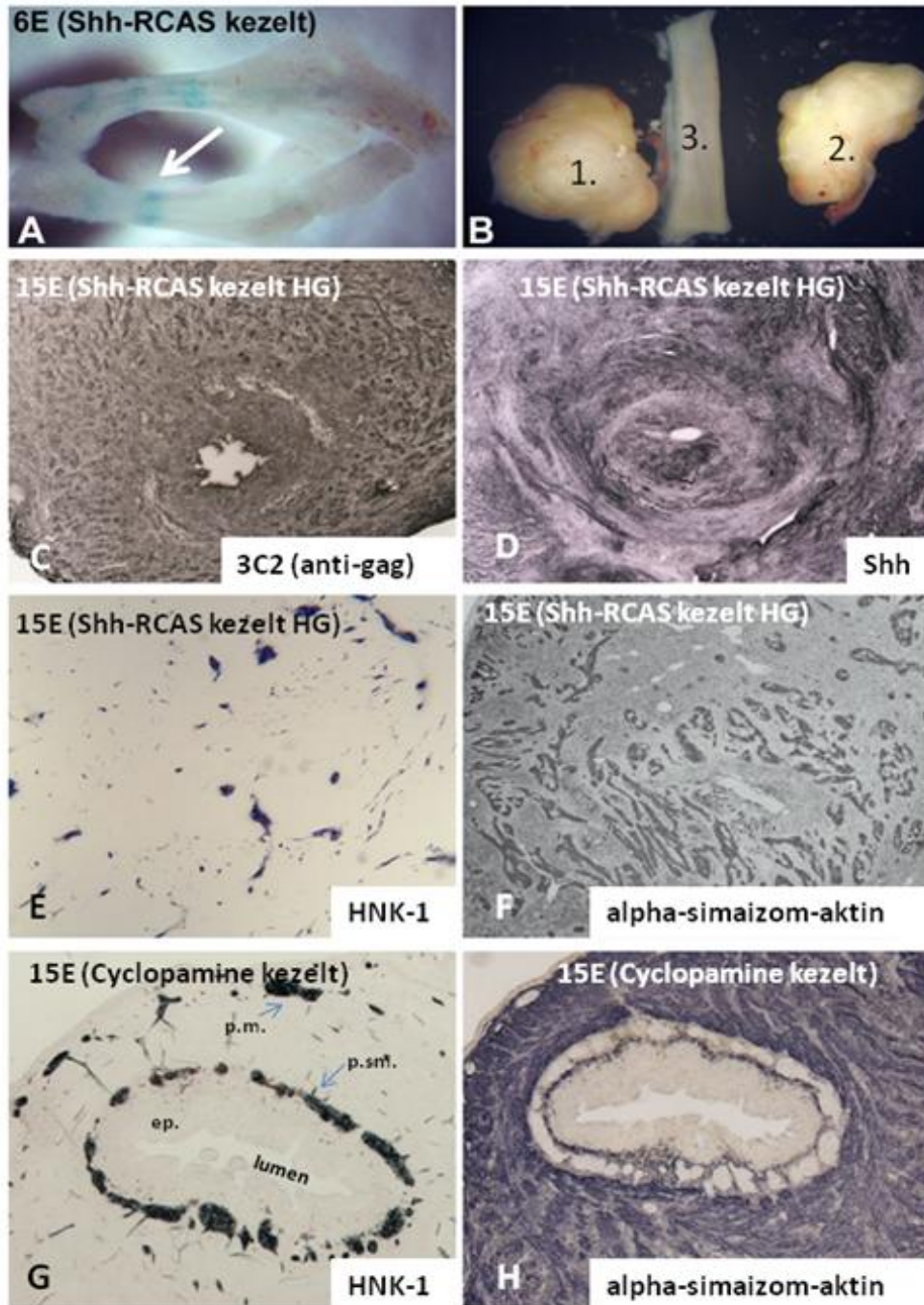
A 6 napos embryonalis vastagbél 2 nap morfogént nem tartalmazó kollagénmátrixban, majd 7 nap chorioallantois membránon történő tenyésztése nem okozott jelentős morfológiai eltérést az összességében 15 napos embryo vastagbelének szövettani struktúrájához képest. Az tunica muscularis mindkét esetben jól fejlett volt, látható a belső oldalán a plexus submucosus, valamint a külső helyzetű plexus myentericus. A lamina muscularis mucosae (nyíl) (**10. ábra, B kép**) jól elkülönül a tunica

muscularistól. A Shh kezelés meggátolta a simaizom differenciálódását; fragmentált izomszövet alkotja a tunica muscularist. A lamina muscularis mucosae kifejezett. A ganglionok száma és mérete jóval kisebb, elszórtnan egy-egy sejt alkotja, elhelyezkedésük rendszertelen, ektopikus (**10. ábra, C kép**). A cyclopamine kezelt metszeten a plexus submucosus, szinte összefüggő, hyperganglionózist mutat. Helyenként ektopikus ganglionok is megjelennek. Érdekes adat, hogy a lamina muscularis mucosae ebben az esetben szinte teljesen hiányzott (**10. ábra, D kép**). A Shh és cyclopamine kezelés eredményei egyaránt azt sugallják, hogy a molekulák hatása irreverzibilisen megváltoztatja a bélidegrendszer fejlődését.



**10. ábra: A Sonic hedgehog és a cyclopamine kezelés in vivo hatása I.** A.) 15 napos kontroll csirke embryo vastagbél keresztmetszet B.) 6 napos embryoból izolált bél 48 óra kollagén gélben és ezt követő 7 napig CAM-on tenyésztett vastagbél keresztmetszete (6+2+7). C.) 6 napos embryonális vastagbél + 48 óra tenyésztés 3 $\mu$ M Shh-t tartalmazó gélben + 7 nap CAM tenyésztés (6+2+7E) D.) 6 napos embryonális vastagbél + 48 óra tenyésztés cyclopamine-t tartalmazó gélben + 7 nap CAM tenyésztés (6+2+7E). HNK-1 markerrel (zöld) jelöltük a ganglionléc sejteket és alpha-simaizom aktinnal (piros) a simaizom sejteket.

Mivel a CAM transzplantációt megelőző gélben történő tenyésztés során a shh morfogén és receptorának inhibitora csak rövid ideig fejt ki közvetlen hatását a vastagbél ganglionléc eredetű sejteire, ezért olyan módszert választottunk, ahol a kísérletesen bejuttatott Shh folyamatosan jelen van a fejlődő bélidegrendszer környezetében. A kísérlet során Shh gént tartalmazó RCAS (Rous-sarcoma vírustól módosított, replikáció kompetens vírus) retrovírusok alkalmazásával, valamint cyclopamine oldat mikroinjektálásával követjük nyomon a Shh kezelés hosszú távú hatását. Az Shh-RCAS mikroinjektálást követően a retrovírus beépül az osztódó sejtek genomjába **(11. ábra, A-C kép)** és 24 órával később fokozott Shh termelést indukál **(11. ábra, D kép)**. Az osztódó sejtekben bekövetkező RCAS festődést 24 órával az injektálás után a vírus ENV-gag fehérjéjét felismerő 3C2 monoklonális ellenanyag immuncytokémiájával lehet kimutatni. Anti-Shh festéssel a bélhámsejtekben kívül termelődő Shh fehérjét is lehet detektálni. Shh-RCAS fertőzött vastagbélszakaszok anti-Shh immuncytokémiai festése mesenchymális sejtekben is intenzív Shh termelődést mutatott **(11. ábra, D kép)**. A Shh-RCAS kezelt vastagbél makroszkópos mérete eltért az azonos korú kontroll vastagbél méretéhez viszonyítva. A magas Shh koncentráció serkentette a mesenchyma sejtek proliferációját, emiatt a bélszakasz megnagyobodott **(11. ábra, B/1-2. kép)**. A kezelés hatására megváltozott a radiális szimmetria, összemosódtak a bélfal rétegei és hasonlóan az előző kísérletekből kapott fenotípushoz a ganglionok száma és mérete jóval kisebb és az elhelyezkedésük is rendezetlen, ektopikus volt **(11. ábra, E kép)**. A Shh ugyanakkor gátolta az izomszövet differenciálódását, ezért az izomréteg fragmentált megjelenést mutat **(11. ábra, F kép)**. A cyclopamine injektálás hatására a kezelt bélszakasz plexus submucosusának hyperganglionózisa figyelhető meg. A cyclopamine nem okozott simaizomréteg fragmentációt, ehelyett a simaizomréteg rendellenes megvastagodása figyelhető meg és helyenként egy-egy ektopikus ganglion fordul elő a simaizomsejtek között **(11. ábra, G, H kép)**.

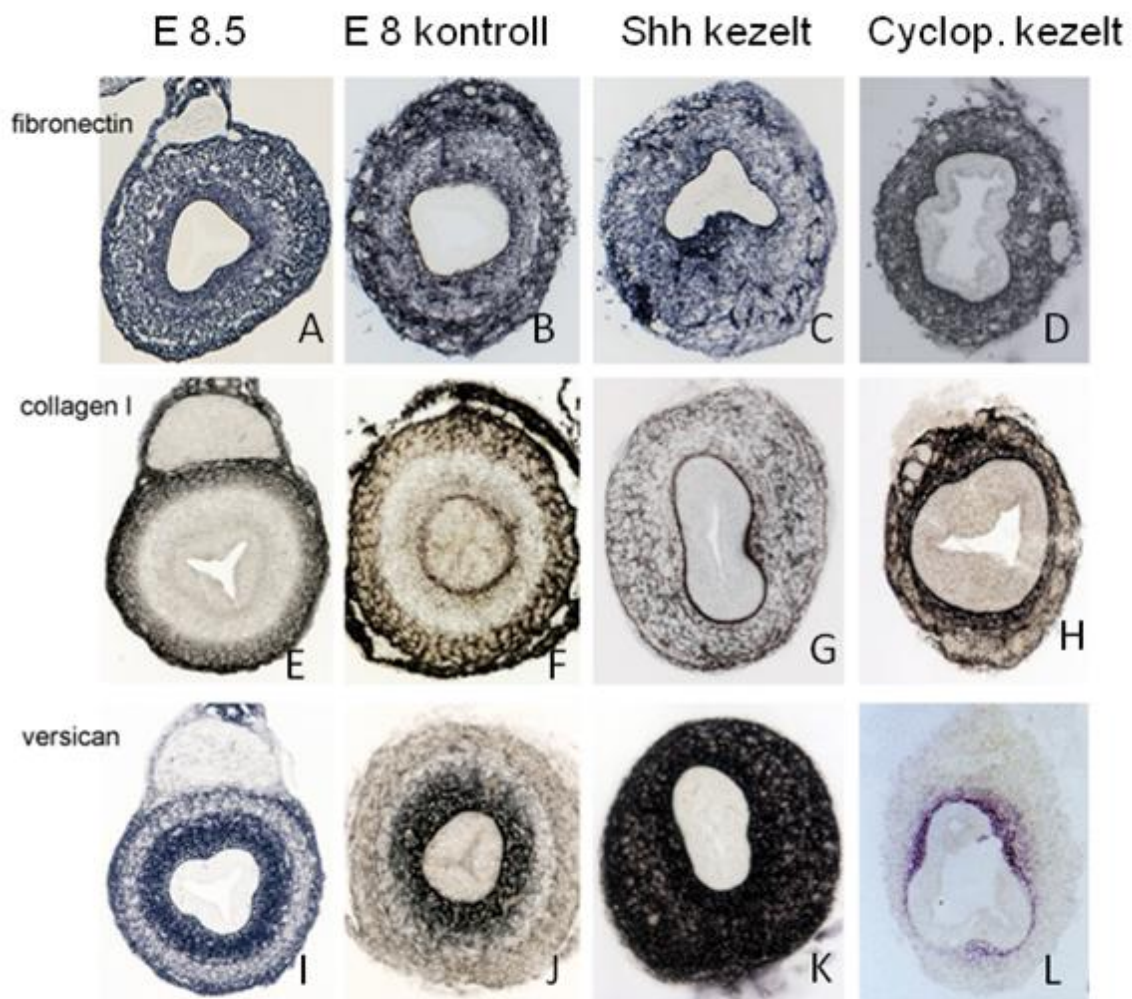


**11. ábra: A Shh-RCAS és a cyclopamine kezelés in vivo hatása II: RCAS injektálás + CAM tenyészet.**  
**A.)** 6 napos csirke embryoból izolált vastagbél-coecum-disztális vékonybél részletének makroszkópos képe mikroinjektálás után. A fehér nyíl az injektálás helyét mutatja, mely a 0,1%-os Fast Green festéknek köszönhetően zöldes foltként látható. Az izolált béldarabot 3-3 helyen (proximálisan, középen és disztálisan) injektáltuk. **B.) 1-2.:** 15 napos Shh-RCAS kezelt és **3.:** kontrol vastagbél makroszkópos összehasonlítása. **C.)** 15E Shh-RCAS kezelt vastagbél kersztmetszetének RCAS Retrovírus tokfehérjét (3C2 anti-gag) jelölő immunfestése, **D.)** anti-Shh **E.)** ganglionléc markerrel (HNK-1) és **F.)** alpha-simaizom-actint felismerő immuncytokémiai jelölése. **G.)** 15E cyclopamine kezelt vastagbél kersztmetszetének ganglionléc markerrel (HNK-1) jelölve a plexus submucosus területén megnagyobbodott ganglionokat mutat (nyíl) **H.)** alpha-simaizom-actinnal történő immunfestése megvastagodott simaizomréteget jelöl. **Ep:** epithelium.

#### **5.4. A sonic hedgehog hatása a bél extracelluláris mátrixára.**

Mivel az Shh kezelések hatása a bélcső mesenchymális sejteinek differenciálódását jelentősen befolyásolta, ezért munkánk következő célja az volt, hogy a kollagén gélben tenyésztett vastagbélben összehasonlítsuk a ganglionlécsejtek vándorlását serkentő és/vagy gátló mátrixfehérjék expresszióját. Ezért vizsgálatainkhoz olyan mátrix fehérjéket választottunk, melyekről korábbi irodalmi adatokból lehetett tudni, hogy serkentik vagy gátolják a korai ganglionléc sejtek vándorlását. Sejtvándorlást serkenti: laminin, fibronectin, kollagén VI, kollagén I; sejtvándorlást gátló: versican, kollagén IX. Az eredmények bemutatásához a fibronektint, a kollagén I-et és a versicant emeltük ki, amelyek között egyaránt van serkentő és gátló hatású is. A fibronectin expressziója számottevő módon nem csökkent a különböző kezelések során **(12. ábra, A-D kép)**. A kollagén I expressziója a kontrollban **(12. ábra, E kép)** hasonló volt a normál embryohoz **(12. ábra, F kép)**, eloszlása ugyan némileg eltért, de az immunfeszítés intenzitása nem változott. A versicán molekula esetében, (mely gátló hatású proteoglikán a vándorló ganglionlécsejtekre nézve) a Shh kezelés hatására fokozott termelődése figyelhető meg **(12. ábra, K kép)**. Míg a cyclopamine kezelés esetében a versican expressziója kifejezetten lecsökkent, csak a hám alatt közvetlenül fejeződött ki **(12. ábra, L kép)**.



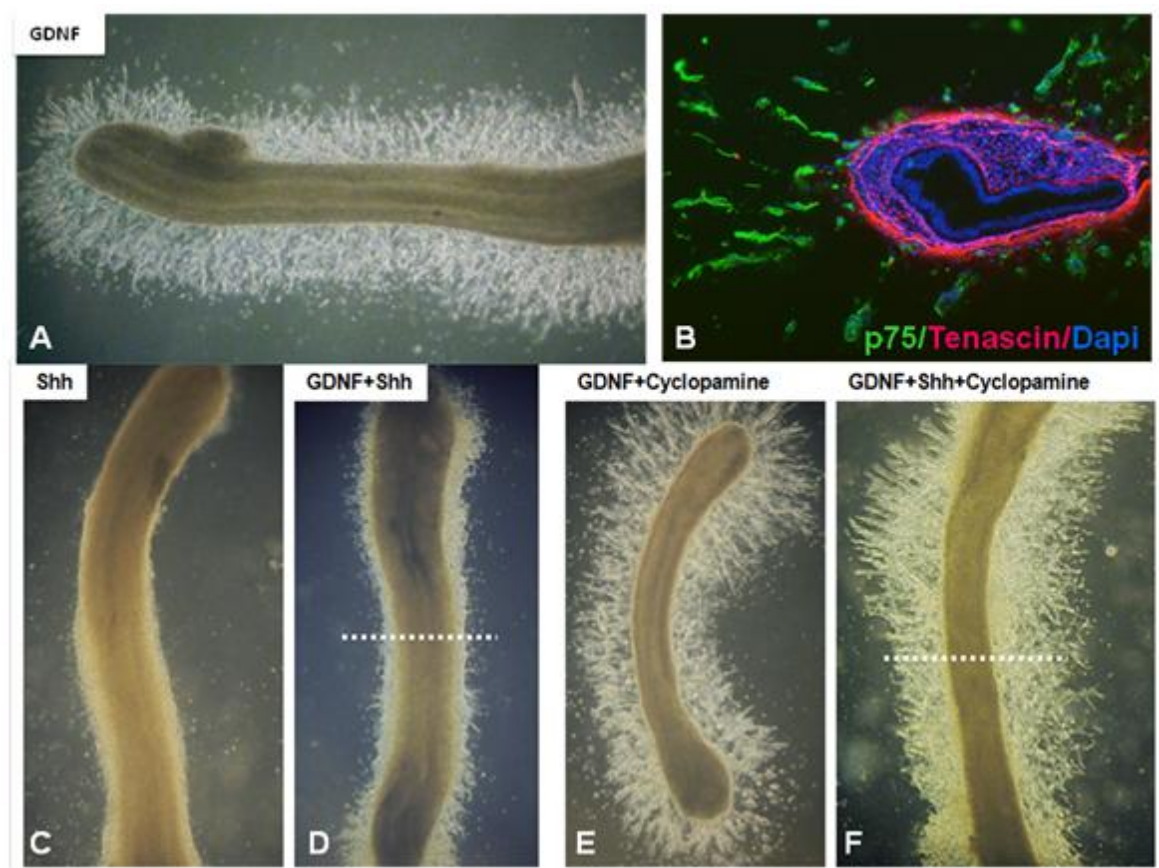


12. ábra: Az extracelluláris mátrix fehérjék expressziójának változása a Shh kezelés hatására. A.) B.) C.) D.): fibronectin; E.) F.) G.) H.): kollagén I.) J.) K.) L.): versican; 8 és fél napos (E8.5) embryo vastagbél keresztmetszete (A, E, I); 6+2 nap kollagén tenyésztett kontroll (B, F, J); 6+2 E Shh kezelt (C, G, K) és cyclopamine kezelt vastagbélszakasz sorozatmetszetei (D, H, L)

### 5.5. Az epitheliális Shh és a mesenchymális GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor) növekedési faktor kölcsönhatásának vizsgálata.

Egér embryoban végzett vizsgálatok szerint a Shh növekedési faktor gátolja a bél mesenchymában termelődő GDNF fehérje ganglionléc sejtek vándorlására kifejtett kemoattraktáns hatását (Fu és mtsai. 2004). A csirke embryoval végzett kísérleteink következő szakaszaiban Fu és mtsai. (2004) által leírt módszert alkalmaztuk, kiegészítve a Shh jelátvitelt gátló cyclopamine kezelés és GDNF kombinációval. A kísérlet során 7 napos embryok vékonybelét kollagén gélben tenyésztettük, amelybe előzetesen 10µg/ml

GDNF-et oldottunk. A GDNF hatására 48 óra tenyésztés után nagyszámú sejt vándorolt ki a gélbe (13. ábra, A kép). A gélből kiperparált belet lemetszettük és p75 markerrel megfestettük. Az immunfluoreszcens festés igazolta, hogy a kivándorolt sejtek ganglionléc sejtek voltak (13. ábra, B kép). Shh a gélbe oldva nem indukált sejt kivándorlást (13. ábra, C kép) és amikor a Shh-al együtt alkalmaztuk a mesenchymális eredetű GDNF-et, akkor a Shh meggátolta a GDNF korábban megfigyelt sejt vándorlást serkentő hatását (13. ábra, D kép). Cyclopamine-t adva a GDNF-hez, azt tapasztaltuk, hogy nem befolyásolta annak hatását; a ganglionlécsejtek kivándoroltak a gélbe (13. ábra, E kép). Ugyanakkor, ha a 2 morfogént és a shh jelátvitel inhibitorát (GDNF + Shh + cyclopamine) együtt kombinálva adtuk a tenyészethez a Shh jelátvitel cyclopamine-nal történő specifikus gátlása révén a GDNF kemoattraktáns hatása újból érvényesült (13. ábra, F kép).



**13. ábra: Shh jelátvitel hatása a GDNF indukált sejt vándorlásra.** Kollagén mátrixban 48 órát tenyésztett 8 napos csirke embriók vékonybelének sztereomikroszkópos képe. **A.)** 10ng/ml koncentrációban GDNF-et tartalmazó kollagén gélben tenyésztett bélszakaszból jelentős sejt kivándorlás észlelhető **B.)** p75 immunfluoreszcens festés jelöli a kivándorló ganglionléc sejteket (zöld), tenascin (piros) a bélfal mesenchymális elemeit jelöli, Dapi (kék) magfestés. **C.)** 2µg/ml Shh jelenlétében nincs sejt kivándorlás. **D.)** 10ng/ml GDNF + 2µg/ml Shh tartalmú gélben tenyésztett bélszakaszból kivándorolt sejtek a bél közelében lokalizálódnak. **E.)** 10ng/ml GDNF + 1,2µM cyclopamine és **F.)** GDNF+ Shh+ cyclopamine.

## VI. Eredmények megbeszélése és konklúzió:

Habár az elmúlt évtizedekben sok adat gyűlt össze a bélidegrendszer fejlődésével és működésével kapcsolatban. Mégis viszonylag kevés információval rendelkezünk a enterális idegrendszert érintő veleszületett megbetegedések háttéréről és kialakulásának mechanizmusáról. A bélidegrendszert érintő fejlődési anomáliák közül a hypoganglionózissal vagy a hyperganglionózissal és ectopicus ganglionok megjelenésével együtt járó neurondiszpláziák és az aganglionózissal jellemzett Hirschsprung-kór a leggyakoribb (Friedmacher és Puri, 2013; Schappi és mtsai., 2013). Ezeknek a betegségeknek a háttérében bizonyítottan nagy szerepük van a GDNF (glia- eredetű neurotrop növekedési faktor), Endothelin-3, BMP-4 mesenchymális faktorok jelátviteli folyamataiban fellépő genetikai elváltozások, de felvetődik a bél epitheliumból származó faktorok szerepe is, úgymint a netrin, mely kemoattraktáns hatású a ganglionléc sejtekre, valamint a Hedgehog fehérjék, amelynek szerepe, hatásmechanizmusa viszont egyelőre kevésbé tisztázott. Habár a bélhámsejtekben termelt sonic hedgehog (Shh) növekedési faktor nagymértékben befolyásolja a béltraktus mesenchymális elemeinek differenciálódását, meghatározza a bélcső radiális szimmetria mentén történő, mégis a bélidegrendszer normális és kóros fejlődésében szerepet játszó hám-mesenchyma közötti kölcsönhatásokról csak kevés ismerettel rendelkezünk (Liu és Ngan, 2014).

Szakdolgozati munkám elsődleges célkitűzése volt a ganglionléc eredetű sejtek vándorlásának és differenciálódásának a nyomon követése csirke embryóban, majd a csirke embryót, mint modellt használva micromanipulációs kísérletekkel tanulmányozni a Shh növekedési faktor hatását a vastagbél idegrendszer fejlődésére. Az Shh-nak bélidegrendszer differenciálódásában betöltött szerepe mellett, a bélcső mesenchymális komponenseire kifejtett hatását is vizsgáltuk. Eredményeink szerint, az epitheliális eredetű Shh növekedési faktor elsősorban az embryonális bélcső differenciálatlan mesenchymális kompartmentjére hat, aminek módosításával közvetett módon a ganglionléc sejtek vándorlását és proliferációját is szabályozza.

A ganglionléc eredetű sejtek általános molekuláris markere emlősökben és madárembryóban a HNK-1 (CD57) sejtfelszíni fehérje. A HNK-1 ellenes ellenanyag valamennyi madárfajban működik, de a hátránya az, hogy a béltraktus kolonizációja idején (5-7 napos embryo) a mesenchyma sejteket is jelöli. A háttérfestés miatt nehezen lehet megkülönböztetni a vastagbelet kolonizáló, legelől vándorló ganglionléc-eredetű sejteket

(wavefront cells) a környező mesenchymális sejtektől (Luider és mtsai., 1992; Nagy és Goldstein, 2006; Nagy és mtsai., 2012). Ennek kiküszöbölésére részletes immuncytokémia karakterizálást végeztünk olyan ellenanyagok bevonásával, amelyek emlősökben a korai ganglionléc sejteket is jelölik. A p75-öt és az N-cadherint felismerő ellenanyagok immunfestésével igazoltuk, hogy HNK-1 markerrel együtt, specifikusan a madár embryo ganglionléc sejtjeit jelölik. Kettős immunfluoreszcenciával kimutattuk, hogy a korábban ismert HNK-1 marker mellett, a p75 (neurotrophin receptor) specifikus ellenanyag is alkalmas a ganglionléc sejtek azonosítására. A p75, egy specifikus poliklonális ellenanyag, melynek előnye a HNK-1-el szemben, hogy a submucosalis plexus körül a mesenchymát nem festi, illetve poliklonális volta több lehetőséget biztosít számunkra a javarészt IgG1-es izotípusú egér monoklonális antitestekkel történő kettős immunfluoreszcens jelölések során. Ezzel a kísérlettel hozzájárultam a laborunk és két külföldi kutatócsoport kollaborációs munkájához. A szakdolgozatom 6. Ábrájának H és I fotója szerepel a témavezetőm fejlődő bélidegrendszer immuncytokémiai karakterizálásáról szóló közleményében is (lásd.: Nagy és mtsai., 2012; Fig. 6 I,J).

Az Shh jelátvitel bélidegrendszer fejlődésére gyakorolt hatását eddig egér és zebrahal embryokon vizsgálták, de az ide vonatkozó adatok ellentmondásosak. Fu és munkatársai (2004) szerint az Shh gátolja a ganglionléc sejtek differenciálódását és vándorlását, de serkenti osztódásukat. Shh<sup>-/-</sup> null mutáns egérembryóban ectopikus ganglionok fejlődtek a bélfalban, míg az Shh-val rokon, szintén bélhámában termelődő, Ihh (indian hedgehog) mutáns embryok vastagbélében ganglionmentes területek találhatóak. A hedgehog fehérjék szerepét igazolja, hogy a Hirschsprung kórban szenvedő betegek részletes genomikai analízise a hedgehog fehérjék receptorának (Patched 1; Ptc1) mutációját is kimutatta (Ngan és mtsai., 2011). Zebrahal esetében leírták, hogy a Ptc1 kifejeződik a vándorló ganglionléc sejtekben és az Shh szükséges a bélidegrendszer ganglionléc sejtjeinek vándorlásához (Reichenbach és mtsai., 2008). Egér embryokat vizsgálva egyes publikációk szerint az emlős ganglionléc sejtek felszínén kimutatható a Shh receptor (Ptc1), míg más közlemények ennek ellenkezőjét állítják (Fu és mtsai., 2004; Washington és mtsai., 2005; Ngan és mtsai., 2011). Ptc1 expresszióját humán embryo bélidegrendszerében eddig még nem vizsgálták. Eddigi adatok szerint korai csirke embryo béltraktusának mesenchymájában leírták a Ptc1 receptor expresszióját, de részletes fejlődésbiológiai vizsgálat a Shh-Ptc1 jelátvitel enterális ganglionléc sejtek fejlődésére gyakorolt hatásáról nem készült (Sukegawa és mtsai., 2000). Előzetes Ptc-1 in situ

hibridizáció és p75/HNK1 immuncitokémia csirke vastagbél metszetein végzett együttes alkalmazása nem igazolta egyértelműen a két molekula koexpresszióját, ezért felmerült annak a lehetősége, hogy az Shh gátló hatása nem a bélidegrendszer sejteire közvetlenül hat, hanem a mesenchymán keresztül érvényesül. A mesenchymális elemek karakterizálásának első lépésében az extracelluláris mátrix fehérjéket hasonlítottuk össze az Shh és Cyclopamin kezelt vastagbélben. Olyan mátrixfehérjék analízisét végeztük el, melyekről már korábbi irodalmi adatok ismert volt, hogy serkentik (laminin, fibronectin, collagén I) vagy gátolják (versican, collagén IX) a korai ganglionléc sejtek vándorlását. Fujimoto és társai úgy vélték, hogy a laminin és collagén IV kiemelt szerepet játszik a ganglionléc sejtek vándorlásában (Fujimoto és mtsai, 1989). Kapur és társai is megállapították, hogy a mesenchymát érintő defektusok negatívan befolyásolják a sejtek migrációját (Kapur és mtsai, 1995). Parikh és társai feltételezése szerint, az extracelluláris mátrix fehérjék, mint például a simaizomrétegben található laminin, abnormális eloszlása felelős az aganglionozisért és fontos szerepet játszanak a neuron és glia irányú differenciálódásában (Parikh és mtsai, 1992). Vaos kutatásai szerint bármilyen eltérés, amely a fejlődő bél mikrokörnyezetét érinti a myentericus plexus veleszületett rendellenességeit okozhatják (Vaos, 1989; Holschneider és Kunst, 2005). Az extracelluláris fehérjékkel végzett összehasonlító immunfestésekből kapott eredményeim nem mondtak ellent a korábbi publikációkban közölteknek; közel megegyező koncentrációban mindegyik mátrix fehérjét sikerült kimutatni a kezelt bélszakaszokban, azonban kivételt képez a gátló hatású versican kifejeződésében megfigyelt változás. Normál esetben a versican expressziója az embryonalis bélső leendő submucosalis mesenchymájára korlátozódik, de az Shh kezelések hatására az expressziója jelentősen megemelkedett és a bélfal teljes vastagságára kiterjedt. Ez a kifejezett és kiterjedt versican expresszió lehetséges magyarázat arra, hogy az Shh a versican termelés fokozásával akadályozhatta meg ganglionléc sejtek bélben történő vándorlását. Ezt a feltételezést alátámasztani látszik Fedstova és munkatársainak (2003) munkája, akik csirke embryóban végzett kísérletekkel kimutatták, hogy ganglion trigeminale neuronjait létrehozó ganglionléc eredetű sejtek ectopicus Shh hozzáadás hatására a craniális ganglionlécből származó sejtek nem vándoroltak a ganglion képződésének helyére. Ugyanebben a cikkben találunk adatot arra vonatkozólag is, hogy az Shh hatására a versican ectopicusan termelődött a fej mesenchymájában. Továbbá, Dutt és munkatársai (2006) in vitro kimutatták, hogy tenyésztett velőcsőből kivándorló ganglionléc sejtek fibronectinen történő migrációját a versican teljesen meggátolta. Annak igazolására, hogy ez hasonló

mechanizmus szerint zajlik a bélfalban vándorló ganglionléc eredetű sejtek esetében is, további vizsgálatokat igényel.

Az extracelluláris fehérjék expressziójával párhuzamosan megvizsgáltuk a mesenchymában termelődő GDNF kemoattraktáns fehérje ganglionléc sejtekre kifejtett hatását valamint azt, hogy GDNF-et miként befolyásolja a Shh és a Cyclopamine kezelés. Kísérleti adataink szerint a Shh csirke embryóban gátolja a GDNF ganglionlécsejtekre gyakorolt kemoattraktáns hatását. Az eredmény megegyezik Fu és mtsai (2004) egérembrion kapott eredményeivel. Ugyanakkor a cyclopamine a Shh Ptc1 receptorához kötődve gátolja az Shh jelátviteli folyamatokat, alkalmazásával kiegészítve új adatokat is találtunk az Shh-GDNF közti kölcsönhatásra. Eredményeink szerint a Cyclopamine-Shh-GDNF együttes alkalmazása során a GDNF kemoattraktáns hatása érvényesült, ami felveti annak lehetőségét, hogy az Shh a Ptc1 receptoron keresztül hatva gátolja a GDNF-et. Egy másik lehetőség, hogy a Shh hatása gyorsabban érvényesül, azaz úgy módosul a mesenchyma (megemelkedik a versican expresszió), hogy a GDNF kemoattraktáns hatása már nem tud kialakulni.

Habár eddigi eredményeink azt igazolják, hogy a bélhamban termelt Shh növekedési faktor révén a hám-mesenchyma kölcsönhatások meghatározó szerepet játszanak a Hirschsprung-kórra jellemző rendellenes bélidegrendszer fejlődésében, mégis a szakdolgozati munkám végére még számos további kérdés maradt nyitva. Meghatározásra vár a Ptc1 receptorok pontos expressziójának feltérképezése a béltraktus ganglionléc eredetű sejtekkel történő kolonizációja előtti és utáni stádiumokban. Lehetséges alternatíva a Ptc1 kimutatására in vitro ganglionléc sejtek tenyésztése után végzett PCR analízis. Izolált ganglionlécsejtek Shh jelenlétében történő tenyésztésével a mesenchymális környezettől függetlenül lehetne vizsgálni az epitheliális faktor hatását. Egyelőre tisztázatlan az is, hogy ha a Shh gátolja az izomsejtek differenciálódást, akkor a tunica muscularis miként befolyásolhatja a bélidegrendszer plexusainak fejlődését.

## **VII. A szakdolgozati munkából bemutatott konferencia előadások**

- 1.) **Barad Csilla** Mária, SE ÁOK III.: A vastagbélidegrendszer embryonális fejlődésének karakterizálása madár embryóban. Semmelweis Egyetem TDK Konferencia 2011 február 16-18. Budapest
- 2.) **Barad Csilla**, V évf, AOK. Entodermális és mesenchymális eredetű növekedési faktorok kölcsönhatásának szerepe a vastagbél idegrendszerének fejlődésében. Semmelweis Egyetem TDK Konferencia 2013 február 13-15. Budapest
- 3.) I. díj: **Barad Csilla**, V évf, AOK. Entodermális és mesenchymális eredetű növekedési faktorok kölcsönhatásának szerepe a vastagbél idegrendszerének fejlődésében. XX. Tudományos DiákkörimKonferencia 2013. március 21-24. Marosvásárhely
- 4.) II. díj: **Barad Csilla**, IV évf, AOK. A sonic hedgehog növekedési faktor szerepe a vastagbél idegrendszerének fejlődésében. XVII. Korányi Frigyes Tudományos Fórum, 2012 április 19-20, Budapest.
- 5.) **Barad Csilla**, IV évf, AOK. A sonic hedgehog növekedési faktor szerepe a vastagbél idegrendszerének fejlődésében. Semmelweis Egyetem, TDK Konferencia, 2012 február 15-17, Budapest.
- 6.) **Barad Csilla**, V évf, AOK. Entodermális és mesenchymális eredetű növekedési faktorok kölcsönhatásának szerepe a vastagbél idegrendszerének fejlődésében. XVIII. Korányi Frigyes Tudományos Fórum, 2013 április 18-19, Budapest.
- 7.) **Barad Csilla**, Nagy Nándor. A sonic hedgehog növekedési faktor szerepe a vastagbél idegrendszerének fejlődésében. A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa, 2012 június 10-13, Debrecen
- 8.) **Csilla Barad**, Nándor Nagy. Gut epithelium derived sonic hedgehog regulates the extracellular matrix during formation of the intestinal nervous system. Hungarian Molecular Life Science, 5-7 April 2013, Siófok
- 9.) **Barad Csilla**, Nagy Nándor. Gut epithelium derived sonic hedgehog regulates the extracellular matrix during formation of the intestinal nervous system. Magyar Anatómus Társaság 2013. évi Kongresszusa, 2013 június 13-15, Budapest

## **VIII. Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Nagy Nándornak, a Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Laboratórium vezetőjének, aki munkám során mindvégig támogatott és mellettem állt.

Köszönettel tartozom továbbá laboratóriumunk valamennyi munkatársának, Prof. Dr. Oláh Imre professzor úrnak, Dr. Kocsis Katalinnak, Dr. Herberth-Minkó Krisztinának, Dr. Molnár Dávidnak, Fejszák Nórának, Dr. Dóra Dávidnak, Bódi Ildikónak, Fügedi Jutkának, Vidra Györgynének, Orbán Editnek és Fölker Orsolyának, akik elméleti és gyakorlati tudásukkal, barátságukkal mindvégig a segítségemre voltak.



## **IX. Irodalomjegyzék**

Akbareian SE, Nagy N, Steiger CE, Mably JD, Miller SA, Hotta R, Molnar D, Goldstein AM. (2013). Enteric neural crest-derived cells promote their migration by modifying their microenvironment through tenascin-C production. *Dev Biol.* 382:446-56.

Belkind-Gerson J, Carreon-Rodriguez A, Benedict LA, Steiger C, Pieretti A, Nagy N, Dietrich J, Goldstein AM. (2013). Nestin-expressing cells in the gut give rise to enteric neurons and glial cells. *Neurogastroenterol Motil.* 25:61-9.

Brand-Saberi B, Christ B. (2000). Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. *Curr Top Dev Biol.* 48:1-42.

Burns AJ, Delalande JM, Le Douarin NM. (2002). In ovo transplantation of enteric nervous system precursors from vagal to sacral neural crest results in extensive hindgut colonisation. *Development.* 129:2785-96.

Catala M, Teillet MA, Le Douarin NM. (1995). Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system. *Mech Dev.* 51:51-65

Costa M., Brookes S.J., Hennig G.W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47(Suppl IV):iv15-iv19.

Doyle AM, Roberts DJ, Goldstein AM. (2004). Enteric nervous system patterning in the avian hindgut. *Dev Dyn.* 229:708-12.

Druckenbrod NR, Epstein ML. (2007). Behavior of enteric neural crest-derived cells varies with respect to the migratory wavefront. *Dev Dyn.* 236:84-92.

Dutt S, Kléber M, Matasci M, Sommer L, Zimmermann DR. (2006). Versican V0 and V1 guide migratory neural crest cells. *J Biol Chem.* 281:12123-31.

Fedtsova N, Perris R, Turner EE. (2003). Sonic hedgehog regulates the position of the trigeminal ganglia. *Dev Biol.* 261:456-69.

Friedmacher F, Puri P. (2013). Classification and diagnostic criteria of variants of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 29:855-72.

Fu M, Tam PK, Sham MH, Lui VC. (2004). Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study. *Anat Embryol (Berl).* 208:33-41.

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

Furness J.B., Costa M. (1987). *The enteric nervous system.* Churchill Livingstone, London

Furness J.B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81:87-96.

Goldstein AM, Brewer KC, Doyle AM, Nagy N, Roberts DJ. (2005). BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech Dev.* 122:821-33.

Goldstein AM, Nagy N. (2008). A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo. *Pediatr Res.* 64:326-33

Heanue TA, Pachnis V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci.* 8:466-79.

Holschneider A, Hutson J, Peña A, Beket E, Chatterjee S, Coran A, Davies M, Georgeson K, Grosfeld J, Gupta D, Iwai N, Kluth D, Martucciello G, Moore S, Rintala R, Smith ED, Sripathi DV, Stephens D, Sen S, Ure B, Grasshoff S, Boemers T, Murphy F, Söylet Y, Dübbers M, Kunst M.(2005). Preliminary report on the International Conference for the Development of Standards for the Treatment of Anorectal Malformations. *J Pediatr Surg.* 40:1521-6.

Iba H. (2000). Gene transfer into chicken embryos by retrovirus vectors. *Dev Growth Differ.* 42:213-218.

Lake JI, Heuckeroth RO. (2013). Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 305:G1-24.

Kapur RP, Yost C, Palmiter RD.(1992). A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development.* 116:167-75.

Kapur RP, deSa DJ, Luquette M, Jaffe R. (1995). Hypothesis: pathogenesis of skip areas in long-segment Hirschsprung's disease. *Pediatr Pathol Lab Med.* 15:23-37.

Kapur R.P. (2000). Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: Experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev. Biol.* 227:146-155

Kirchgessner AL, Gershon MD. (1990). Innervation of the pancreas by neurons in the gut. *J Neurosci.* 10:1626-42.

Kolterud A, Grosse AS, Zacharias WJ, Walton KD, Kretovich KE, Madison BB, Waghray M, Ferris JE, Hu C, Merchant JL, Dlugosz AA, Kottmann AH, Gumucio DL. (2009). Paracrine Hedgehog signaling in stomach and intestine: new roles for hedgehog in gastrointestinal patterning. *Gastroenterology.* 137:618-28.

Le Douarin NM, Teillet MA. (1973). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 30:31-48.

Le Douarin NM, Dieterlen-Lievre F, Teillet MA, Ziller C. (2000). Interspecific chimeras in avian embryos. *Methods Mol Biol.* 135:373-386.

Leenders E, Sieber WK. (1970). Congenital megacolon observation by Frederick Ruysch--1691. *J Pediatr Surg.* 5:1-3.

Luidier TM, Peters-van der Sanden MJ, Molenaar JC, Tibboel D, van der Kamp AW, Meijers C. (1992). Characterization of HNK-1 antigens during the formation of the avian enteric nervous system. *Development* 115:561-572.

Metzger M, Caldwell C, Barlow AJ, Burns AJ, Thapar N. (2009). Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders. *Gastroenterology.* 136:2214-25.e1-3.

McKeown SJ, Stamp L, Hao MM, Young HM. (2013). Hirschsprung disease: a developmental disorder of the enteric nervous system. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2:113-29.

Mwizerwa O, Das P, Nagy N, Akbareian SE, Mably JD, Goldstein AM. (2011). Gdnf is mitogenic, neurotrophic, and chemoattractive to enteric neural crest cells in the embryonic colon. *Dev Dyn.* 240:1402-11.

Nagy N, Magyar A, Dávid A, Gumati MK, Oláh I. (2001). Development of the follicle-associated epithelium and the secretory dendritic cell in the bursa of Fabricius of the guinea fowl (*Numida meleagris*) studied by novel monoclonal antibodies. *The Anatomical Record.* 262: 279-292.

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

Nagy N, Goldstein AM. (2006). Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev Biol*. 293:203-17.

Nagy N, Goldstein AM. (2006). Intestinal coelomic transplants: a novel method for studying enteric nervous system development. *Cell Tissue Res*. 326:43-55.

Nagy N, Brewer KC, Mwizerwa O, Goldstein AM. (2007). Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. *Dev Dyn*. 236:73-83.

Nagy N, Mwizerwa O, Yaniv K, Carmel L, Pieretti-Vanmarcke R, Weinstein BM, Goldstein AM. (2009). Endothelial cells promote migration and proliferation of enteric neural crest cells via beta1 integrin signaling. *Dev Biol*. 330:263-72.

Nagy N, Burns AJ, Goldstein AM. (2012). Immunophenotypic characterization of enteric neural crest cells in the developing avian colorectum. *Dev Dyn*. 241:842-51.

Natarajan D, Marcos-Gutierrez C, Pachnis V, de Graaff E. (2002). Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* 129:5151-60.

Ngan ES, Garcia-Barceló MM, Yip BH, Poon HC, Lau ST, Kwok CK, Sat E, Sham MH, Wong KK, Wainwright BJ, Cherny SS, Hui CC, Sham PC, Lui VC, Tam PK. (2011).

Hedgehog/Notch-induced premature gliogenesis represents a new disease mechanism for Hirschsprung disease in mice and humans. *J Clin Invest.* 121:3467-78.

Obermayr F, Hotta R, Enomoto H, Young HM. (2013). Development and developmental disorders of the enteric nervous system. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 10:43-57.

Oláh I, Gumati KH, Nagy N, Magyar A, Kaspers B, Lillehoj H. (2002). Diversity of the K-1 antigen expression by the cortico-medullary and reticular epithelial cells of the bursa of Fabricius in chicken and guine fowl. *Dev Comp Immunol.* 26:481-8.

Parikh DH, Tam PK, Lloyd DA, Van Velzen D, Edgar DH. (1992). Quantitative and qualitative analysis of the extracellular matrix protein, laminin, in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 27:991-5; discussion 995-6.

Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. (2000). Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development.* 127:2763-72.

Reichenbach B, Delalande JM, Kolmogorova E, Prier A, Nguyen T, Smith CM, Holzschuh J, Shepherd IT. (2008). Endoderm-derived Sonic hedgehog and mesoderm Hand2 expression are required for enteric nervous system development in zebrafish. *Dev Biol.* 318:52-64.

Roberts D.J., Smith D.M., Goff D.J., Tabin C.J. (1998). Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Development* 125:2798-2801.

Roberts D.J. (2000). Molecular mechanism of development of the gastrointestinal tract. *Dev. Dyn.* 219:109-120.

Sasselli V, Pachnis V, Burns AJ. (2012). The enteric nervous system. *Dev Biol.* 366:64-73

Schäfer KH, Micci MA, Pasricha PJ. (2009). Neural stem cell transplantation in the enteric nervous system: roadmaps and roadblocks. *Neurogastroenterol Motil.* 21:103-12.

Schäppi MG, Staiano A, Milla PJ, Smith VV, Dias JA, Heuschkel R, Husby S, Mearin ML, Papadopoulou A, Ruemmele FM, Vandenplas Y, Koletzko S. (2013). A practical guide for the diagnosis of primary enteric nervous system disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 57:677-86.

Stern CD. (2005). The chick; a great model system becomes even greater. *Dev Cell.* 8:9-17.

Sukegawa A, Narita T, Kameda T, Saitoh K, Nohno T, Iba H, Yasugi S, Fukuda K. (2000). The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development.* 127:1971-80.

Swenson O., Rheinlander HF., Diamond I. (1949). Hirschsprung's disease; a new concept of the etiology; operative results in 34 patients. *N Engl J Med.* 241:551-6.

Vaos GC. (1989). Quantitative assessment of the stage of neuronal maturation in the developing human fetal gut--a new dimension in the pathogenesis of developmental anomalies of the myenteric plexus. *J Pediatr Surg.* 24:920-5.

Wallace AS, Burns AJ. (2005). Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* 319:367-82.

Washington Smoak I, Byrd NA, Abu-Issa R, Goddeeris MM, Anderson R, Morris J, Yamamura K, Klingensmith J, Meyers EN. (2005). Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development. *Dev Biol.* 283:357-72.

Wells J.M., Melton D.A. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:393-410.