

A CXCL12 kemokin és receptorának (CXCR4) szerepe az utóbélhez asszociált szövetekben zajló sejtvándorlási folyamatokban

Doktori tézisek
Gáspár-Halasy Viktória

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Nagy Nándor, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Sótiné Dr. habil. Bagyánszki Mária, PhD, egyetemi docens

Dr. Tőkés Anna-Mária, PhD, tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Buzás Edit, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Balogh Péter, DSc, egyetemi tanár

Dr. habil. Jakus Zoltán Péter, PhD, egyetemi docens

Budapest, 2024

1. Bevezetés

A CXCL12 kemokin és receptorának (CXCR4) esszenciális szerepét számos sejttípus embryonalis vándorlásában leírták. Ezek a molekulák irányítják a lymphocyták, a cranialis- és cardialis ganglionléc sejtek migrációját, részt vesznek az axon növekedésben, de a bélidegrendszer létrehozó cervicalis- és lumbo-sacralis ganglionléc sejtek vándorlásában betöltött szerepére csak indirekt bizonyítékok, feltételezések vannak. Csirke embryokban írták le először a bélidegrendszer ganglionléc eredetét, amelyekhez a perifériás ganglionokból származó külső idegrostok kapcsolódnak. Az emlősökben és a madarakban egyaránt megtalálható plexus pelvicus, valamint a madárspecifikus Remak-ganglion a lumbo-sacralis ganglionlécből származnak és a distalis bélszakasz extrinsic beidegzését biztosítják, de a fejlődésüket szabályozó molekuláris mechanizmusok nem ismertek, ez pedig kiemelten fontos a bélmotilitási zavarokat okozó Hirschsprung-kór (az 1:5000 gyakoriságú veleszületett neurointesztinális betegség, ahol a distalis bélszakasz belső- és a külső innervációja is egyaránt érintett) patogenezisének megértésében. A Hirschsprung-kórban szenvedő csecsemőknél előforduló életveszélyes fertőzések fokozott kockázata miatt a bélhez asszociált nyirokszervek fejlődéstani vizsgálata is jelentős szereppel bír.

Immunfluoreszcenciával ötvözött *in situ* hibridizációs és embryomanipulációs technikákkal kimutattuk, hogy a farokbimbóban az utóbél idegrendszeréhez kapcsolódó Remak-ganglion és a plexus pelvicus, valamint az utóbélhez asszociált primer nyirokszerv, a bursa Fabricii sejtvándorlási folyamataiban is kulcsszerepet játszik a CXCL12 kemokinnek, és receptorának térben és időben szétválasztott precíz szabályozási rendszere.

2. Célkitűzések

A CXCR4 (C-X-C kemokin receptor 4) jelátvitelnek összetett, stádiumspecifikus szerepe van az embryonális folyamatokban, az őssejtek (ganglionléc sejtek, hematopoetikus sejtek) migrációjának szabályozásában játszott kezdeti funkciójától a differenciált sejtekre gyakorolt szövetspecifikus hatásokig (axon projekció, lymphocyta vándorlás). A bélidegrendszer létrehozó ganglionléc sejtek migrációjának zavara veleszületett neurointesztinális betegségek kialakulásához vezet, amit a colorectum változó hosszúságú aganglionózisa jellemez. A ganglionmentesség mellett, nagyszámú CXCR4+ extrinsic idegrost is megfigyelhető, amelynek kialakulásáról kevés ismerettel rendelkezünk. Az utóbél CXCL12 (C-X-C kemokin ligand 12) *in situ* hibridizációs vizsgálata során megfigyeltük, hogy az extrinsic beidegzést adó Remak-ganglion mellett az utóbélhez asszociált bursa Fabricii mesenchymájában is kifejeződik. A bursa Fabricii lehetőséget kínál arra, hogy a többi vérképző sejtvonaltól függetlenül egy izolált környezetben tanulmányozhassuk a B-sejtek migrációját és fejlődését.

Doktori értekezésemben célul tűztem ki:

A CXCR4-CXCL12 molekulapáros sokrétű feladatának vizsgálatát a fejlődő farokbimbó szöveteiben, azon belül az utóbél külső beidegzésének fejlődésében és az utóbélhez asszociált primer nyirokszerv kialakulása során.

1. A CXCR4 receptor expressziójának nyomonkövetése a bélidegrendszer létrehozó ganglionléc sejtek fejlődése során.
2. A colorectum külső beidegzésének kialakulásának tanulmányozása madár és emlős embryokban.
3. A CXCR4-CXCL12 expressziójának elemzése a bursa Fabricii fejlődésében részt vevő sejt-vándorlási folyamatokban.

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez vad típusú csirke (*Gallus gallus domesticus*, White Leghorn típus; Prophyl-BIOVO Ltd., Magyarország), transzgénikus zöld fluoreszcens fehérjét (green fluorescent protein, GFP; Prof. Helen Sang és Dr. Adam Balic, The Roslin Institute, UK) expresszáló csirke és *Wnt1^{Cre/+}Rosa26^{flox-mTRed-Stop-flox-mGFP}* egér (*Mus musculus*) embryokat (Dr. Jakus Zoltán, Semmelweis Egyetem, Dr. Liam Ridge, UCL GOS Institute of Child Health, UK) használtunk. A puffertolt 4%-os paraformaldehidben (PFA) fixált abortált humán embryokon végzett szövettani munkát a Semmelweis Egyetem Regionális és Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága etikailag jóváhagyta (Kutatásetikai Bizottság jóváhagyása: 70/2012).

3.2. Fluoreszcens immuncitokémia

A fluoreszcens immuncitokémiát 4% PFA-val fixált szövetekből (utóbél, farokbimbó, embryomanipulációs graft) készített 12 μm vastagságú fagyasztott metszeteken végeztük. A metszeteken a primer ellenanyagokat [anti-alpha simaizom aktin (SMA), anti-agyi zsírsavkötő protein (BFABP), anti-csirke neuron (CN), anti-CXCR4, desmin, E-cadherin, anti-GFP, anti-human natural killer-1 glycoprotein (HNK1), anti-ELAV-szerű protein-4 (HuC/D), anti-neurofilament, anti-neurotrophin receptor (P75), anti-SRY-kötő HMG-box transzkripciósi faktor (SOX10), anti- β III tubulin (TUJ1)] 1-3 órán át szobahőmérsékleten vagy egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk, majd Alexa fluorokrómmal kapcsolt szekunder ellenanyagokkal (Thermo Fisher Scientific) 1:200 hígításban, 45 percig szobahőmérsékleten előhívtuk. A sejtmagjelölést 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihidrochloride, Invitrogen) reagenssel végeztük, végül a metszeteket vízdékony fedőanyaggal (Aqua-Poly/Mount, Polysciences) fedtük le, majd Zeiss LSM780 és Olympus Fluoview 3000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.2.1. Teljes szöveti fluoreszcens immuncitokémia

A Remak-ganglion morfológiai fejlődésének tanulmányozásához 6, 9, 12 és 14 napos (E) csirke embryok utóbeleit izoláltuk, majd 4 %-os PFA-ban egy éjszakán át 4°C-on fixáltuk. A szöveteket permeabilizáltuk 0,1 %-os Triton-X (Thermo Fisher Scientific) 1x-es PBS oldatával egy éjszakán át 70 rpm-en rázatva 4°C-on. A beleket 1:400-ban hígított TUJ1 primer ellenanyag és 1 %-os kecske szérumban (Vector), majd Alexa Fluor kecskében készült anti-egér IgG (H+L) 488 szekunder ellenanyaggal inkubáltuk 1-1 órán át szobahőmérsékleten 70 rpm fordulatszámon. A beleket Nikon SMZ25 fluoreszcens sztereomikroszkóppal vizsgáltuk.

3.3. *In situ* hibridizáció

Az *in situ* hibridizációhoz a *Cxcr4* és *Cxcl12* antiszensz szekvenciákat tartalmazó plazmidokat Dr. Beate Brand-Saberi (Ruhr-Universität Bochum, Németország) laboratóriumából kaptuk, amelyekből előbb „Maxiprep”-et készítettünk, a DNS-t linearizáltuk, majd digoxigeninnel jelölt RNS-próbát hoztunk létre standard protokollok alapján. A fluoreszcens immuncitokémiával kombinált *in situ* hibridizációs felvételeket Nikon Eclipse E800 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.4. GFP-Remak-ganglion kiméra

Annak meghatározására, hogy a Remak-ganglion szerves részét képezi a bélidegrendszernek, fluoreszcens jelölést végeztünk a különböző szövetrészek elkülönítésére. 6 napos csirke embryok postcoecalis bélszakaszát mikropreparációra alkalmas eszközök segítségével sztereomikroszkóp alatt izoláltuk, eltávolítottuk a Remak-gangliont és ugyanolyan korú GFP csirke embryoból származó Remak-ganglionnal helyettesítettük azonos orientációban. A kísérletesen rekombinált szövet 24 órára 3-dimenziós kollagén mátrixba ágyztuk, majd egy 9 napos csirke embryo CAM membránjára ültettük és további 7 napig inkubáltuk a kiméra szerveket (túlélés 80%, n=5) (1.ábra).

3.5. Bursa Fabricii GFP-CAM kiméra

A E9 napos vad típusú csirke embryokból izolált bursa Fabricii előtelepeket E9 napos GFP-csirke CAM membránjára transzplantáltuk, amelyből a GFP+ vérképző sejtek képesek voltak kolonizálni a bursát. A CXCR4 jelátvitelt gátló kísérletekhez a bursa primordiumok mesenchymájába 1 μ l 200 μ M AMD3100-at (Sigma Aldrich) injektáltuk, a kontroll bursákba a kísérleti mintákban oldószerként használt 1 μ l steril 1x PBS-oldatot juttattunk, és a GFP-CAM membránon tenyésztettük 9 napig (túlélés: 70%, n=6/kezelési csoport). A szövettani feldolgozás után tanulmányoztuk a kiméra graftok morfológiáját és a karakterizáltuk a bevándorolt sejteket.

3.6. *In vitro* sejtmigrációs kultúra

Migrációs tesztet alkalmaztunk a CXCL12 növekedési faktor *in vitro* vizsgálatára. A tenyésztés során Remak-gangliont is tartalmazó E6 csirke utóbeleket az oldalukra fektetve helyeztünk 20 μ g/ml fibronektinnel (Thermo Fisher Scientific) bevolt Petri-csészébe. A tenyésztést 4 ml DMEM/F12 (Sigma Aldrich) médiumban végeztünk, melyhez CXCL12 (100 ng/ml; R&D Systems), CXCL12 (100 ng/ml) +AMD3100 (200 μ M, Sigma Aldrich) inhibítort vagy GDNF (10 ng/ml; R&D Systems) növekedési faktort adtunk (n=5/kezelési csoport). 24 órás tenyésztés után teljes szöveti fluoreszcens immuncitokémiát végeztünk, ahol a TUJ1+ extrinsic idegrostokat és a SOX10+ ganglionléc sejtek számát vizsgáltuk a különböző kezelésekre hatására.

3.7. Függesztett szervtenyészet

Az extrinsic idegrendszer struktúrájának vizsgálatához függesztett szervtenyészeteket hoztunk létre. 6 napos csirke embryok izolált bélszakaszait rovartűk segítségével rögzítettük szilikonnal bevont steril Petri-csészék aljához, oly módon, hogy ne tapadjanak le a szilikonhoz, hanem minden felületén egyenletesen érintkezzen a médiummal. A kísérletben a kontroll csoport DMEM/F12 médiuma nem tartalmazott növekedési faktort, a CXCR4-CXCL12 jelátvitel tanulmányozásához 200 μ M-os AMD3100 inhibítort mértünk a tápoldathoz (n=5/kezelési csoport). A 72 órás tenyésztési idő után TUJ1 „whole mount” immunfluoreszcens beleken az idegrostok számát, hosszúságát és szélességét vizsgáltuk, továbbá CN, valamint HU immunfluoreszcenciával az intrinsic plexusok neuronjainak sejttestjeit és rostjainak számát mértük meg.

3.8. Mikrogyöngy implantáció

A CXCR4-CXCL12 jelátvitel szöveten belüli idegrostnövekedést befolyásoló vizsgálatára mikrogyöngy technikát alkalmaztunk, amivel a vizsgálni kívánt növekedési faktorok lokálisan kifejtett hatását lehetett tanulmányozni. A heparin-akril gyöngyöket (átmérő: 70-150 μ m, Sigma Aldrich) a kontrollként használt 20 μ g/ml BSA, 20 μ g/ml CXCL12 rekombináns protein, illetve az 1 mM AMD3100 inhibitor steril 1x-es PBS oldatába áztattuk és E5 csirke embryo utóbél mesenchymájába ültettük, majd CAM membránon tenyésztettük 9 napig (túlélés: 70%, n=5/kezelési csoport). Az utóbél graftokban TUJ1 immunfluoreszcenciával a gyöngyök 300 μ m-es környezetében a vizsgáltuk az idegrostok számát és vastagságát.

4. Eredmények

4.1. A CXCR4 receptor expressziójának nyomonkövetése a bélidegrendszert létrehozó ganglionléc sejtek fejlődése során.

A különböző ganglionléc sejtpopulációk CXCR4 expressziós mintázatának jellemzésére csirke embryok sorozatmetszeteit anti-CXCR4 és ganglionléc specifikus anti-SOX10 ellenanyagokkal jelöltük meg a cervicalis, a törzsi és a lumbo-sacralis ganglionléc sejtek kivándorlásának kezdetekor a 13. és a 20. Hamburger-Hamilton (HH) stádiumban (2. és 3. embryonális nap). A CXCR4 specifikusan kifejeződik a SOX10+ cervicalis régióból kivándorló ganglionléc sejtekben. Ezen a populáción belül az 1. és 3. szomita magasságban intenzív CXCR4 immunreaktivitást találtunk a velőcső mellett és a garatívek mesenchymájában elhelyezkedő cardialis ganglionléc sejtekben, ugyanakkor a 4. szomitától caudalisan kivándorló ganglionléc sejtek fokozatosan csökkenő CXCR4 kifejeződést mutattak. Ellentétben a cervicalis ganglionléccel, a delaminálódó korai és későbbi stádiumú törzsi vagy a lumbo-sacralis szegmensből származó sejtek nem fejezik ki a CXCR4 receptort.

4.1.1.A CXCR4 receptort a lumbo-sacralis ganglionléc-eredetű Remak-ganglion fejezi ki

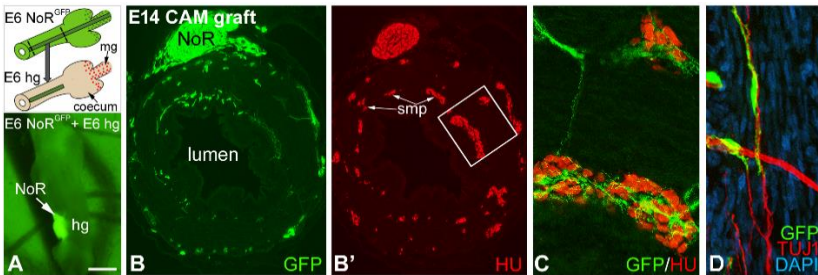
A CXCR4 teljeskörű expressziójának meghatározására a csirke-embryo utóbél régiójában a ganglionléc sejtek kolonizációjának és differenciálódásának periódusaiban CXCR4 immuncitokémiát ötvöztük bélidegrendszer specifikus P75, CN, HU és BFABP ellenanyagokkal. A CXCR4 átmeneti expressziója az utóbél külső beidegzését adó Remak-ganglion CN+ idegrostjain (és nem a BFABP+ gliasejtjein) mutatható ki, amikor a P75+ Remak-ganglionból származó rostok a bélfal irányába növekednek, majd a beidegzés kialakulása után a

CXCR4 immunreaktivitásuk lecsökken. A HU+/CN+ antigéneket hordozó belső neurális plexusok nem hordozzák felszínükön a CXCR4 receptort.

4.2. A colorectum külső beidegzésének kialakulásának tanulmányozása madár és emlős embryokban

4.2.1. A Remak-ganglion rostjai részt vesznek az utóbél mesenchymájának és a neurális plexusainak beidegzésében

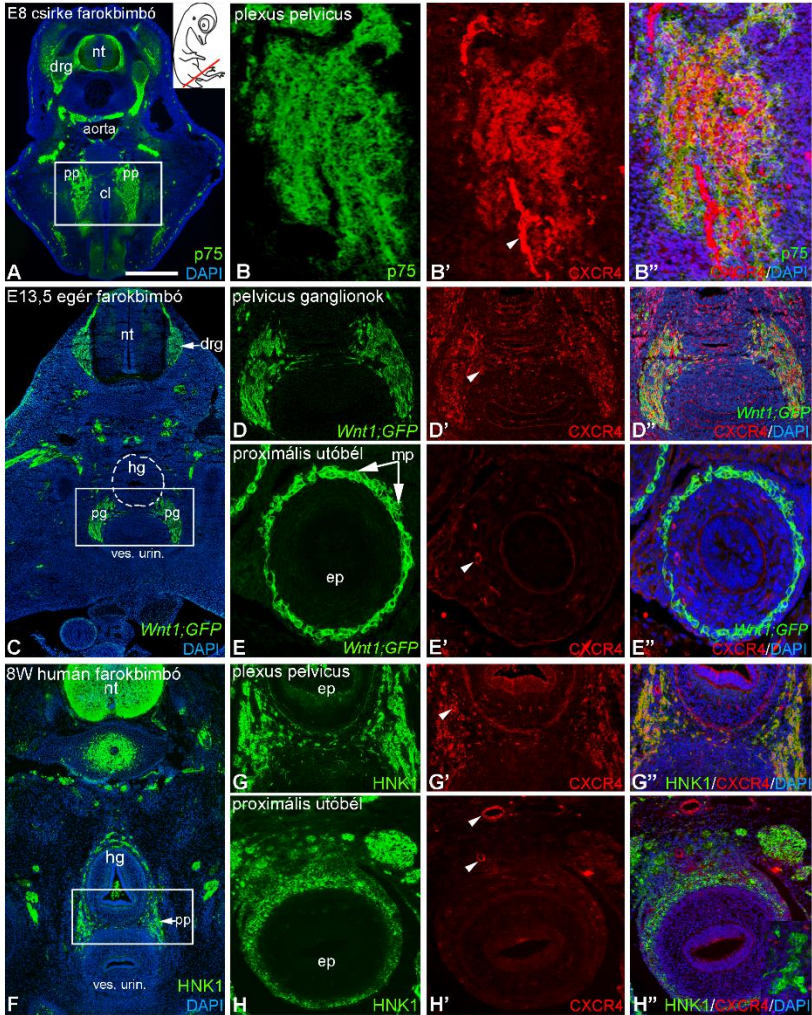
A Remak-ganglion és a bélidegrendszer kapcsolatának meghatározására *ex vivo* szövet rekombinációt ötvöztünk CAM technikával. Az utóbél tenyészeteket teljes mértékben kolonizálták a cervicalis ganglionléc sejtek, amelyek normális morfológiájú bélidegrendszert alakítottak ki. Számos GFP+ rost van jelen a CAM-graftokban, amely azt mutatja, hogy a donor GFP+ csirke Remak-ganglionból származó idegrostok képesek belenőni az utóbél falába és az enterális ganglionokat is behálózják (1. ábra).



1. ábra. A Remak-ganglionból származó rostok beidegzik az enterális ganglionokat. **A)** A Remak-ganglion rekombináció illusztrációja és a CAM-ra ültetett kiméra. **B)** Az utóbél graft GFP+ Remak-ganglion eredetű idegrostokat tartalmaz, amik elérik az intrinsic plexusok neuronjainak **B'**, **C)** HU+ sejttestjeit és **D)** TUJ1+ nyúlványait. A méretarányt jelölő vonal az **A** képen található: **A)** 400 μ m; **B, B')** 170 μ m; **C, D)** 40 μ m; CAM, chorioallantois membrán; E, embryonális nap; ep, utóbél epithelium; hg, utóbél; mg, középbel; NoR, Remak-ganglion; smp, plexus submucosus.

4.2.2. A pelvicus ganglionok CXCR4 receptort expresszálnak

A madár és emlős embryokban az utóbél külső innervációját biztosító plexus pelvicut a lumbo-sacralis ganglionléc eredetű sejtek hozzák létre. Csirkében a 8. embryonális napon CXCR4+ sejtek voltak jelen a Remak-ganglion folytatásába eső P75+ plexus pelvicusban, amiben HU és neurofilamentum antigént expresszáló neurális elemek mutathatók ki. Az E13.5 napos Wnt1;GFP transzgenikus egerek farokbimbójának sorozatmetszetei alapján a distalis utóbél és a húgyhólyag között páros struktúraként kifejlődő pelvicus ganglionok szintén kifejezik a CXCR4-et. Az egérrel megegyező képet kaptunk a humán embryo vizsgálatokor is. A ganglionléc sejtekre specifikus HNK1-el kirajzolódó plexus pelvicus ganglionsejtei hordozzák felszínükön a CXCR4 receptort. Az egér és a human embryoban is a bélidegrendszer intrinsic elemei a csirkéhez hasonlóan CXCR4 negatívak (2. ábra).



2. ábra: A pelvis ganglionok CXCR4 expressziót mutatnak csirke és emlős embryokban. A-B'') 8 napos csirke, **C-E'')** 13,5 napos Wnt1;GFP egér és **F-H'')** 8 hetes human embryo farokbimbó keresztmetszetein fluoreszcens immuncitokémiát végeztünk. A méretarányt jelölő vonal az A képen található: **A)** 450 μ m; **B-B'')** 110 μ m; **C)** 350 μ m; **D-D'')** 180 μ m; **E-E'')** 90 μ m; **F)** 350 μ m; **G-G'')** 150 μ m; **H-H'')** 120 μ m. *cl*, cloaca; *drg*, dorsalis érző ganglion; *E*, embryonális nap; *ep*, utóbél epithelium; *hg*, utóbél; *nt*, velőcső; *pg*, pelvis ganglion; *pp*, plexus pelvis; *ves.urin*, vesica urinaria; *W*, posztnatális hetek száma.

4.2.3.A *Cxcr4* receptor és a *Cxcl12* ligand mRNS expressziója csirke embryóban

Hasonlóan az immuncitokémiai eredményekhez, a *Cxcr4* mRNS E6. és E10. között kimutatható a Remak-ganglionban és a plexus pelviciusban. A CXCL12 kifejeződése dinamikusan változott, először az E6. napon a Remak-gangliont körülvevő mesenchymális sejtekben, majd (E8) a bélhámában és a muscularis externa szövetében, később (E14) az intrinsic ganglionok termelik nagy mennyiségben a kemokint.

Összefoglalva eredményeink azt mutatják, hogy a CXCR4 a Remak-ganglionban és az utóbélben a CXCL12 expressziójával komplementer mintázattal fejeződik ki, és összefüggésben van az utóbél extrinsic beidegzésének kialakulásával.

4.2.4. A CXCL12 elősegíti a Remak-ganglionból eredő neuritok növekedését *in vitro*.

A Remak-ganglion és a bélidegrendszer eredetű neuritok növekedésének tanulmányozásához *in vitro* kísérleteket végeztünk. 100 ng/ml CXCL12 hozzáadása a tenyésztő médiumhoz erőteljes neurit növekedést eredményezett a Remak-ganglionból. Ezzel ellentétben a CXCL12 nem volt hatással a velőcső cervicalis szakaszából eredő intesztinális ganglionléc sejtek vándorlására, míg a glia eredetű növekedési faktor (GDNF) 10 ng/ml koncentrációban történő alkalmazása erőteljes sejt migrációt indukált a kiültetett bélszakaszból. A 200 μ M AMD3100 (CXCL12 antagonist) kezelés a Remak-ganglion eredetű axonhálózat kialakulásának gátlásához vezetett az utóbélben. A CXCL12 kezelés szignifikánsan nagyobb mértékű Remak-ganglion eredetű neurális kinövést indukált a fibronektinnel bevont felületre, mely sejtnyúlványok átlagosan nagyobb távolságot tettek meg, az inhibitor kezeléshez vagy a kontrollhoz képest. SOX10+ sejtek voltak azonosíthatóak a

rostok mentén. A CXCL12 kezelés hatására számottevően több ganglionléc eredetű sejt vándorolt ki a bélből, mint a DMEM, valamint az AMD3100 kezelt tenyészetek esetében.

4.2.5. A CXCR4 jelátvitel gátlásakor nem alakul ki a bél extrinsic beidegzése.

A CXCR4-CXCL12 jelátvitel vizsgálatának érdekében függesztett szervtenyészetekben vizsgáltuk a TUJ1 antigént expresszáló idegrostok fejlődését az utóbél külső beidegzésének kialakulása során. A kontroll tenyésztési-körülmények között (E6+72h DMEM) tartott utóbélbe vándorolt enterális ganglionléc sejtek eloszlási mintázata a 9 napos (E9) embrionális stádiumhoz hasonlít, és TUJ1+ Remak-ganglion-eredetű külső idegrostok hatoltak a bélfalba. Az AMD3100 hozzáadása nem zavarta meg az enterális ganglionléc sejtek migrációját és eloszlási mintázatát, azonban gátolta a TUJ1+ idegrostok Remak-ganglionból kiinduló projekcióját. Az inhibitorral kezelt utóbelekben szignifikánsan csökkent az idegrostok száma, hossza és vastagsága.

4.2.6. A CXCL12 chemoattraktáns faktorként hat az extrinsic idegrostokra *ex vivo*

Amikor 5 napos preganglionált utóbeleket 9 napig tenyésztettünk CAM membránon azt tapasztaltuk, hogy az extrinsic idegrostok a belső plexusok jelenléte nélkül is képesek az utóbél innervációjára. A rostokat számos SOX10+ sejt kísérte. A heparin-mikrogyöngy alapú CXCL12 kemokin lokális alkalmazása szignifikánsan megnövelte a gyöngyök környezetében detektálható extrinsic idegrostok számát és vastagságát, az AMD3100 és a BSA kezeléshez képest.

4.3. A CXCR4-CXCL12 expressziójának elemzése a bursa Fabricii fejlődésében részt vevő sejtváncorlási folyamatokban

4.3.1. CXCR4 mRNS lokalizációja a bursa Fabricii fejlődése során

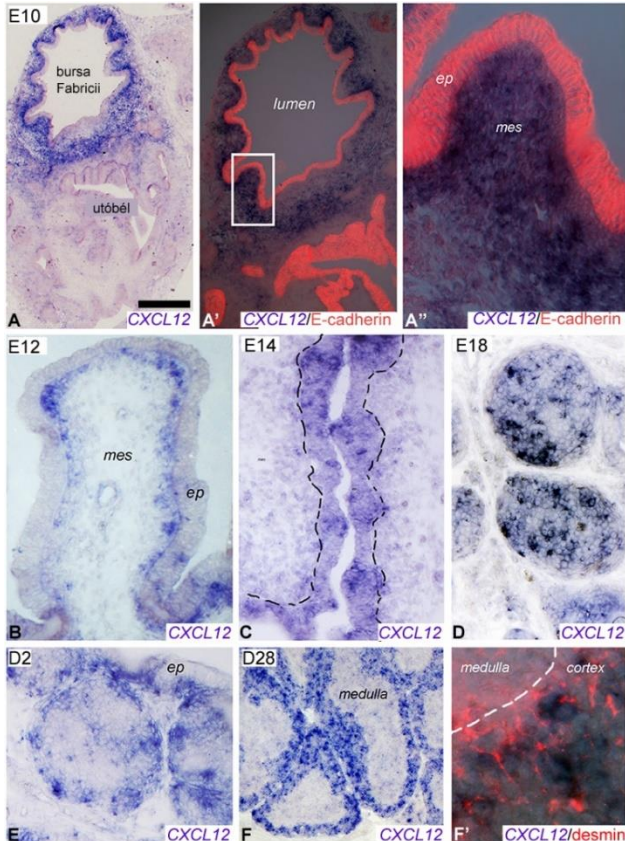
A fejlődő csirke embryo utóbelének részletes *in situ* hibridizációs és immuncitokémiai elemzése során megfigyeltük, hogy az utóbélhez asszociált primer nyirokszervben, a bursa Fabricii-ben a B-sejtek fejlődése idején is kifejeződik a *CXCR4* receptor. A bursa Fabricii ontogenezise során *CXCR4 in situ* hibridizációval kimutatható sejtek először a 10. embryonális napon (E10) detektálhatók a bursa előtelepének hám alatti mesenhymájában. A következő fejlődési stádiumban (E14) a *CXCR4+* sejtek a bursa mesenchymáján kívül, a fejlődő folliculusbimbókban is azonosíthatók. A 18. embryonális napra a *CXCR4* mRNS-ének kifejeződése felerősödik a folliculusbimbók területén a nagyszámban jelen lévő B-sejtek miatt. A kikelés környékén a *CXCR4 in situ* hibridizációs jelöléssel már jól elkülöníthető a folliculusok kéreg- és velőállománya, viszont a velőállomány halványabb jelölést mutat. A kikelést követő 28. napra (D28) a *CXCR4* jel főként a folliculusok kéregállományi területén válik kifejezettebbé.

4.3.2. CXCL12 mRNS expressziója a bursa Fabricii különböző fejlődési stádiumaiban.

A *CXCR4* receptor mRNS-ének kifejeződésével párhuzamosan megvizsgáltuk a receptor ligandjának, a *CXCL12* mRNS-ének bursa Fabricii-n belüli megjelenését is. A 10. embryonális napon a *CXCL12* kiterjedt expressziót mutatott a bursa előtelep hám alatti mesenchymális részében.

A 12-14. embryonális napra a *CXCL12* kifejeződése a fejlődő folliculusbimbók területére korlátozódott. A 18. embryonális napon a mesenchymális expresszió szinte teljesen eltűnt és a *CXCL12* pozitívitas az egyre nagyobb számban megjelenő folliculusbimbókra volt jellemző. Kikelés után, a bursai folliculusok kéregállományának differenciálódásával párhuzamosan, a *CXCL12* jel a folliculusok külső részén kondenzálódott. A kikelést követő 28. napon, a *CXCL12* transzkriptum az érett bursai folliculusok kéregállományában volt jelen, ahol expressziója a desmin pozitív mesenchymalis reticulum sejteket jellemezte. Az E18 stádiumú bursa metszeteken végzett kettős immuncitokémiai jelöléssel igazoltuk, hogy a bursai szekréción dendritikus sejtek (BSDC) expresszálják a *CXCL12* mRNS-ét. A velőállományi BSDC sejtek *CXCL12* expressziója csak átmeneti folyamat, amelyet a kikelést követően a kéregállományi desmin pozitív mesenchymális retikuláris sejtek vesznek át (3.ábra).

Összefoglalva, a *CXCR4* expressziója komplementer módon a *CXCL12* ligand kifejeződését követi az embryonális és a kikelést követő fejlődési stádiumokban. Az a megfigyelés, hogy a *CXCL12* expressziós mintázata korlátozott, és idővel változik, ahhoz a hipotézishez vezetett, hogy a *CXCL12* fontos szerepet játszik a B-sejt vándorlás minden szakaszában, beleértve a bursa előtelepének kolonizációját (első migrációs lépés), a folliculus bimbókba történő homingot (második migrációs lépés), majd a B-sejtek cortex területére lépésével a folliculusokban kialakuló kéreg és velőállomány elválását (harmadik migrációs lépés) is támogatja.



3. ábra. A CXCL12 expressziója a bursa Fabricii fejlődése során. A-A'') A 10. embryonális napon (E10) a subepiteliális mesenchyma erősen CXCL12 pozitív. **B)** A 12. napos embryóban (E12) a CXCL12 közvetlenül az epithelium alatt mutatható ki, ami **C)** a 14. embryonális napra már a fejlődő folliculusbimbók területén jelenik meg (szaggatott vonal jelzi az epithelium alatt húzódó basalis membránt). **D)** Kikelés előtt (E18) a kialakuló folliculusbimbók nagy mennyiségben termelik a CXCL12-t. **E)** A kikelést követő 2. napon (D2) a differenciálódó cortex területére korlátozódik a CXCL12 expresszió, amely **F)** a kikelés utáni 28. napra válik egyértelművé, amikor **F')** a kéregállományi desmin pozitív retikuláris sejtek CXCL12 mRNS-t fejeznek ki (a szaggatott vonal a cortico-medullaris határt jelöli). A méretarányt jelölő vonal az A képen található: **A)** 300 µm; **A')** 200 µm; **A'')** 60 µm; **B)** 100 µm; **C, D, E)** 80 µm; **F)** 150 µm; **F')** 40 µm. *E, embryonális nap; ep, epithelium; D, kikelés utáni napok száma; mes, mesenchyma.*

4.3.3.A CXCR4-CXCL12 jelátvitel funkciója a bursa Fabricii fejlődésében

Annak bizonyítására, hogy *ex vivo*, a CXCR4+ bursai B-sejtek migrációját a CXCL12 kemokin irányítja, embryomanipulációs vizsgálatokat végeztünk. A kísérlet során a E9 napos bursa előtelepeket 1µl 200µM AMD3100 vagy kontrollként 1x PBS oldattal injektáltuk és GFP-CAM membránon tenyésztettük 9 napig. Az izolált graftok komparatív elemzése az AMD3100-kezelt bursák jelentősen kisebb méretét mutatta a kontrollhoz viszonyítva. Míg a kontroll csoportokban az anti-chB6, illetve az anti-CXCR4 ellenanyaggal a B-sejteket tartalmazó folliculusbimbók homogéneen jelölődtek, addig az AMD3100 nagy mértékben gátolta a folliculusok kifejlődését, amelyekben csak néhány elszórt chB6+, CXCR4+ sejt volt látható. A CXCR4-CXCL12 szignalizáció gátlása nem befolyásolta a granulopoiesist és a dendritikus-prekurzorok bevándorlását a folliculusbimbókba, mivel számos GRL1+ sejt volt jelen a graftokban, illetve a CSF1R festés nyúlványos immunreaktív sejteket mutatott ki a vizsgált folliculusokban. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a CXCR4–CXCL12 jelátvitel gátlása megakadályozta a B-sejt prekurzorok bevándorlását a folliculusbimbókba, ami B-sejt-mentes folliculusok kialakulásához vezetett, és a bursa Fabricii csökevényes fejlődését idézte elő.

5. Következtetések

1. Igazoltuk, hogy a CXCR4 kemokin receptor intenzíven kifejeződik a cardialis ganglionléc sejtekben, de a bélidegrendszert kialakító cervicalis és lumbo-sacralis sejteken nem mutatható ki a gasztrointesztinális traktus kolonizációja során.

2. Immunfluoreszcens és *in situ* hibridizációs eredményeink azt bizonyítják, hogy a humán, egér és csirke embryokban az utóbél külső beidegzéséért felelős lumbo-sacralis ganglionléc eredetű plexus pelvicus és a Remak-ganglion neuronjai CXCR4 pozitívak. Továbbá meghatároztuk, hogy a CXCR4 receptor ligandja (CXCL12) a fejlődő bél simaizomzatában, epitheliumában és később az intrinsic ganglionokban termelődik.

3. Az általunk kifejlesztett Remak-ganglion rekombinációs kísérletekkel és velőcső transzplantációval igazoltuk a Remak-ganglion eredetű idegrostok és az intrinsic ganglionok kapcsolatát. Ezekkel a módszerekkel bizonyítottuk azt is, hogy az enterális plexusok jelenléte nélkül is végbemegy a bél extrinsic beidegzése.

4. Szervtenyészetekkel, valamint mikrogyöngy implantációs kísérletekkel kimutattuk, hogy a CXCR4 és a CXCL12 molekulák irányítják az utóbél extrinsic beidegzésének fejlődését. A CXCR4-CXCL12 jelátvitel blokkolása megakadályozta a Remak-ganglion idegrostjainak utóbél irányú növekedését.

5. *In situ* hibridizációs eredményeink alapján azt találtuk, hogy az utóbélhez asszociált primer nyirokszerv, a bursa Fabricii B-sejt kolonizációs folyamataiban is részt vesz a CXCR4-CXCL12 molekulapáros. Kimutattuk, hogy a CXCR4-CXCL12 mRNS-tartalom dinamikusan változik a bursa Fabricii fejlődésének különböző stádiumai között.

6. Embriomanipulációs vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a CXCR4-CXCL12 kölcsönhatás nélkülözhetetlen a bursa Fabricii B-sejtekkel történő benépesüléséhez, a szerven belüli migrációjához, illetve az érett B-sejtek perifériára történő kivándorlásához.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Halasy, V., Szöcs, E., Soós, Á., Kovács, T., Pecsénye-Fejszák, N., Hotta, R., Goldstein, A.M. & Nagy, N. (2023). CXCR4 and CXCL12 signaling regulates the development of extrinsic innervation to the colorectum. *Development* 150(8):dev201289. doi: 10.1242/dev.201289.

Nagy, N., Busalt, F., **Halasy, V.**, Kohn, M., Schmieder, S., Fejszak, N., Kaspers, B., & Härtle, S. (2020). In and Out of the Bursa-The Role of CXCR4 in Chicken B Cell Development. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01468>.

6.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:

Kovács, T., **Halasy, V.** (társ-elsőszerző), Pethő, Cs., Szöcs, E., Soós, Á., Dóra, D., de Santa Barbara P., Faure, S., Stavely, R., Goldstein, A.M. & Nagy, N. Essential Role of BMP4 Signaling in the Avian Ceca in Colorectal Enteric Nervous System Development (2023). *International Journal Of Molecular Sciences* 24: 21 Paper: 15664 , 22 p. DOI: 10.3390/ijms242115664.

Gracheva, M., Klencsár, Z., Kovács Kis V., Béres, A. K., May, Z., **Halasy, V.**, Singh, A. Fodor, F., Solti, Á., Kiss, F. L., Tolnai, Gy., Homonnay, Z. & Kovács, K. (2023). Iron nanoparticles for plant nutrition: Synthesis, transformation, and utilization by the roots of *Cucumis sativus*. *Journal of Materials Research* 38, 1035–1047. <https://doi.org/10.1557/s43578-022-00686-z>.

Fejszák, N., Kocsis, K., **Halasy, V.**, Szöcs, E., Soós, Á., Roche, D. von la, Härtle, S., & Nagy, N. (2022). Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a B cell subpopulation in bursa of Fabricius. *Poultry Science* 101(4). <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2022.101711>.

Nagy, N., Kovacs, T., Stavely, R., **Halasy, V.**, Soos, A., Szocs, E., Hotta, R., Graham, H. & Goldstein, A.M. (2021). Avian ceca are indispensable for hindgut enteric nervous system development. *Development* 148(22):dev199825. doi: 10.1242/dev.199825.

Nagy, N., Guyer, R.A., Hotta, R., Zhang, D., Newgreen, D.F., **Halasy, V.**, Kovacs, T. & Goldstein, A.M. (2020). RET overactivation leads to concurrent Hirschsprung disease and intestinal ganglioneuromas. *Development* 147(21):dev190900. doi: 10.1242/dev.190900.

ΣIF: 36,991