

Az epithelio-mesenchymalis kölcsönhatások és az extracelluláris mátrix szerepe a bélidegrendszer fejlődésében

Doktori értekezés

Dr. Barad Csilla Mária

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. habil. Nagy Nándor PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Sótiné Dr. habil. Bagyánszki Mária PhD, egyetemi docens
Dr. Cseh Áron PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:
Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kiss András DSc, egyetemi tanár
Dr. Molnár Kinga PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Tőkés Anna-Mária PhD, tudományos főmunkatárs

Budapest
2019

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|---|-----------|
| 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 5 |
| 2. BEVEZETÉS | 6 |
| 2.1. A bélidegrendszer általános felépítése..... | 7 |
| 2.2. A bélidegrendszer embrionális fejlődése..... | 8 |
| 2.3. A bélidegrendszer fejlődésének molekuláris szabályozása | 13 |
| 2.3.1. <i>Mesenchymalis faktorok</i> | 14 |
| 2.3.2. <i>Transzkripciósfaktorok</i> | 15 |
| 2.3.3. <i>Epithelialis faktorok</i> | 16 |
| 2.4. A bélidegrendszer fejlődését és funkcióját érintő kórképek | 18 |
| 2.4.1. <i>Hirschsprung-kór</i> | 19 |
| 2.4.2. <i>A Hirschsprung-kórhoz asszociált bélidegrendszeri betegségek</i> | 21 |
| 2.4.3. <i>Egyéb bélidegrendszert érintő veleszületett és szerzett rendellenességek</i> | 21 |
| 2.5. A bélidegrendszer rendellenességeinek háttérében álló molekuláris mechanizmusok | 23 |
| 2.6. Az extracelluláris mátrix szerepe a bélidegrendszer normál és patológiás fejlődésében | 26 |
| 2.7. A csirke embrió szerepe a bélidegrendszert érintő betegségek patogenezisének tanulmányozásában..... | 29 |
| 3. CÉLKITŰZÉSEK | 32 |
| 4. MÓDSZEREK | 33 |
| 4.1. Kísérleti állatok..... | 33 |
| 4.2. A minták szövettani feldolgozása | 33 |
| 4.2.1. <i>Zselatinos-szacharózos fagyasztott blokk készítése</i> | 33 |
| 4.3. Immuncitokémia | 34 |
| 4.3.1. <i>Immunhisztokémia</i> | 34 |
| 4.3.2. <i>Teljes szervi („whole mount”) immunfestés</i> | 35 |
| 4.3.3. <i>Immunfluoreszcencia</i> | 35 |
| 4.4. <i>In situ</i> hibridizáció | 36 |
| 4.5. Az immunfestés során felhasznált primer és szekunder ellenanyagok táblázatos összefoglalása | 37 |

| | | |
|--------|--|-----------|
| 4.6. | Sejtosztódás kimutatása bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine: BrdU) és EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) jelöléssel..... | 42 |
| 4.7. | Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás..... | 43 |
| 4.8. | Embriómanipuláció..... | 43 |
| 4.8.1. | Embriótenyésztet | 43 |
| 4.8.2. | A kollagén mátrix elkészítése | 44 |
| 4.8.3. | Chorioallantois membrántenyésztés (CAM)..... | 45 |
| 4.8.4. | Shh-RCAS retrovírus és cyclopamine mikroinjektálása | 45 |
| 4.8.5. | Egér-csirke testüregkiméra | 46 |
| 4.8.6. | Az entericus idegi őssejtek izolációja, felszaporítása és in vitro differenciáltatása | 46 |
| 4.8.7. | Idegi sejtaggregátumok beültetése aneurális csirke utóbélbe | 46 |
| 4.8.8. | In vitro migráció tanulmányozása „stripe-choice assay” módszerrel | 47 |
| 5. | EREDMÉNYEK | 48 |
| 5.1. | A Sonic hedgehog gátolja az embrionális vastagbél bélidegrendszerének fejlődését..... | 48 |
| 5.2. | A Sonic hedgehog jelátvitel hatásának ex vivo chorioallantois membránon történő vizsgálata a vastagbél idegrendszer embrionális fejlődése során..... | 52 |
| 5.3. | A Shh retrovírus-mediált overexpresszió in vivo aganglionózishoz vezet | 54 |
| 5.4. | Shh és Ptc1 expressziója a bélidegrendszer kialakulása során..... | 56 |
| 5.5. | A Shh hatása a bél extracelluláris mátrix mintázatára..... | 58 |
| 5.6. | A Shh közvetlenül nem gátolja a ganglionléc-eredetű sejtek bélben történő vándorlását | 60 |
| 5.7. | A Shh jelátvitel hatása az egér bélidegrendszerének fejlődésére | 61 |
| 5.8. | Az embrionális és a felnőtt bél entericus ganglionjait HSPG fehérjék veszik körül | 62 |
| 5.9. | A legelől vándorló entericus ganglionléc-eredetű sejteket kollagén XVIII veszi körül, az agrin expresszió azonban csak a fejlődő bélidegrendszer későbbi stádiumában jelenik meg | 66 |
| 5.10. | A kollagén XVIII és az agrin expressziójához elengedhetetlen a ganglionléc-eredetű sejtek jelenléte | 68 |
| 5.11. | A ganglionokhoz asszociált kollagén XVIII-at és agrint az entericus ganglionléc-eredetű sejtek termelik..... | 70 |
| 5.12. | Az agrin és a kollagén XVIII hatása az entericus ganglionléc-eredetű sejtek vándorlására.. | 75 |
| 6. | MEGBESZÉLÉS | 78 |
| 7. | KÖVETKEZTETÉSEK | 85 |

| | |
|---|------------|
| 8. ÖSSZEFOGLALÁS | 86 |
| 9. SUMMARY | 87 |
| 10. IRODALOMJEGYZÉK | 88 |
| 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE | 116 |
| 11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk..... | 116 |
| 11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk..... | 116 |
| 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 117 |

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|--------|---|
| CAM | chorioallantois membrán (chorioallantoic membrane) |
| CSPG | kondroitin-szulfát proteoglikán (chondroitin sulfate proteoglycan) |
| E | embrionális nap (embryonic day) |
| ECM | extracelluláris mátrix (extracellular matrix) |
| EdnRB | B-típusú endothelin receptor (Endothelin Receptor type B) |
| ENCC | entericus ganglionléc-eredetű sejt (enteric neural crest cell) |
| ENS | bélidegrendszer (enteric nervous system) |
| Ep. | epithelium |
| ET-3 | endothelin-3 |
| GDNF | glia-eredetű növekedési faktor (glial cell-derived neurotrophic factor) |
| HD | Hirschsprung-kór (Hirschsprung's disease) |
| HSPG | heparán-szulfát proteoglikán (heparan sulfate proteoglycan) |
| L1CAM | L1 sejtadhéziós molekula (L1 cell adhesion molecule) |
| NCC | ganglionléc-eredetű sejt (neural crest-derived cell) |
| NoR | Remak ideg (nerve of Remak) |
| pm | plexus myentericus |
| psm | plexus submucosus |
| Phox2b | Paired-like homeobox 2b |
| RCAS | replikáció-kompetens vírus (replication-competent retrovirus) |
| Ret | tirozin-kináz receptor (Receptor tyrosine kinase) |
| Sox10 | SRY-related HMG-box 10 |

2. BEVEZETÉS

A gasztrointesztinális traktus számos, a szervezet túlélése szempontjából nélkülözhetetlen funkcióért felelős, amelyek szabályozásában elsősorban a saját intrinsic idegrendszerére, a bélidegrendszerre (ENS) támaszkodik. A bélidegrendszer a bélfalban található neuronok és gliasejtek hálózata, mely a perifériás idegrendszer legnagyobb részét képezi. Az elmúlt évek során kitüntetett figyelmet szenteltek tanulmányozására, ennek köszönhetően az eddigi elgondolást, amely alapján az agy egyeduralgoként szabályozza az egész szervezetet, kezdi felváltani a nézet, ami szerint a bélcsatorna idegrendszere jelentős mértékben a központi idegrendszertől függetlenül is képes működni. Automáciájának és morfológia sajátosságainak (a béltraktusban található idegsejtek száma meghaladja a gerincvelő idegsejtjeinek számát) jóvoltából a bélidegrendszert gyakran “második agyként” is emlegetik.

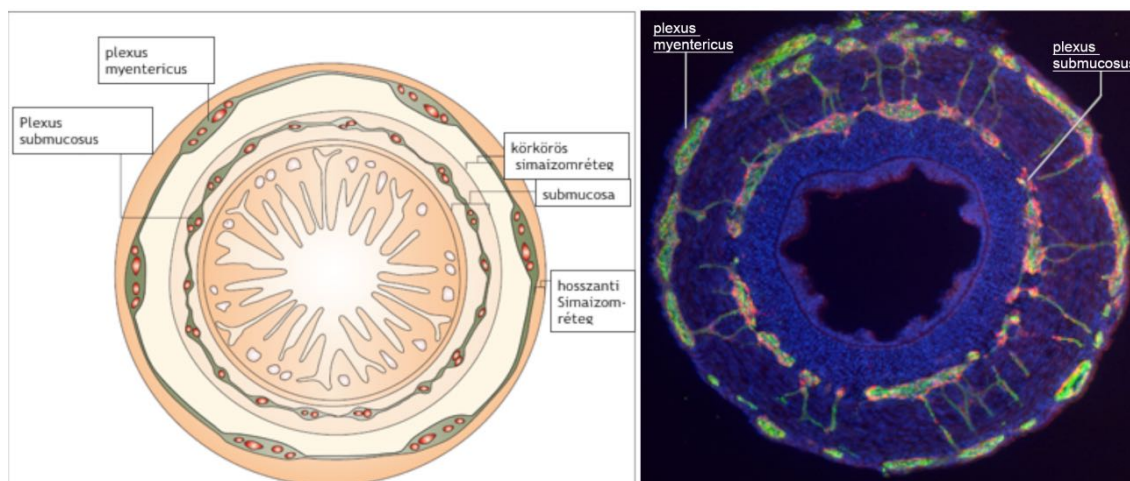
Ezt az igen kiterjedt neuronális hálózatot számos veleszületett és szerzett rendellenesség érintheti, melyek általában a neuronok számbeli eltéréssel vagy differenciálódási abnormalitásával járnak. Jelenleg ezeknek a neurointesztinális betegségeknek a kezelése nagy kihívást jelent a klinikum számára. Az egyik legismertebb ide tartozó patológiás elváltozás a veleszületett megacolon vagy más néven Hirschsprung-kór (HD). A betegséget a vastagbél idegrendszerének hiánya jellemzi és viszonylag nagy arányban fordul elő (1:5000) az újszülöttek körében. A rendellenesen fejlődő bélidegrendszer gyógyítása jelenleg csak sebészi úton lehetséges. A napjainkban zajló intenzív őssejtkutatásoknak köszönhetően a Hirschsprung-kór kezelési alternatívájaként is egyre többször kerül szóba a sejtttranszplantáció lehetősége. A hatékony őssejtttranszplantáció megvalósításához elengedhetetlen az enterális idegrendszert érintő veleszületett megbetegedések molekuláris hátterének megismerése és kialakulásuk fejlődésbiológiai mechanizmusának megértése. A neurointesztinális betegségek kapcsán felmerülő potenciális alkalmazásuk miatt, aktívan vizsgálják felnőtt bélben is a ganglionléc-eredetű őssejtek jelenlétét, mely egy lehetséges forrást biztosítana a hiányzó vagy abnormális entericus neuronok sejttterápián alapuló pótlásához (Burns és mtsai 2016, Hotta és mtsai 2016). Az őssejtek terápiás alkalmazásával szemben támasztott igény maga után vonja a transzplantált őssejteket befogadó mikrokörnyezet ismeretének szükségességét is. A transzplantált sejteket befogadó mikrokörnyezet egyik meghatározó eleme az extracelluláris mátrix (ECM), melynek jelentőségét már a regeneratív medicina is felismerte.

2.1. A bélidegrendszer általános felépítése

A bélidegrendszer a perifériás idegrendszer legnagyobb önálló egysége, a tápcsatorna teljes hosszában megtalálható neuronok és gliasejtek komplex hálózata, mely a gasztrointesztinális traktus számos funkcióját szabályozza, beleértve a bél motilitását is (Furness és Costa 1987). A bélidegrendszer mind strukturális, mind funkcionális szempontból szoros kapcsolatban áll az autonóm ganglionokkal és a központi idegrendszerrel. Némely entericus neuron axonja a bélből kilépve a prevertebrális szimpatikus ganglionokhoz fut, ahonnan az információ a központi idegrendszerbe kerül. Ugyanakkor a különböző szimpatikus és paraszimpatikus idegek posztganglionáris rostjai képesek szabályozni az entericus ganglionok működését (Costa és mtsai 2000, Furness 2000). A két rendszer közötti szoros kapcsolatot alátámasztja továbbá, hogy a központi idegrendszerben megtalálható klasszikus ingerületátvivő anyagokat a bélidegrendszerben is azonosították (Furness és Costa 1987). Mindezek ellenére a bélidegrendszer mégis nagymértékben független a központi idegrendszertől, hozzávetőlegesen 100 millió, 18 különböző osztályba sorolható neuront tartalmaz (Brookes 2001, Schemann 2005). Ezzel a bélidegrendszerben található neuronok száma meghaladja a gerincvelőben fellelhető idegsejteket és ilyen módon a szervezet második legnagyobb neurális hálózatát alkotja. A nervus vagus preganglionáris rostjai csak a duodenum magasságáig futnak, ebből kifolyólag az ettől caudalisabban elhelyezkedő bélszakaszt a “második agyként” is emlegetett bélidegrendszernek kell szabályoznia (Goldstein és mtsai 2013). A bélidegrendszert alkotó neuronok négy fő osztályba sorolhatók: motoneuronok, intrinsic primer afferens neuronok (IPANs), intesztinofugalis neuronok és interneuronok (Brookes 2001). Az entericus ganglionokban található ganglionléc-eredetű neuron és glia sejteken kívül nemrég került leírásra egy harmadik, hematopoetikus eredetű sejtpopuláció, az úgynevezett intraganglionikus makrofágok csoportja. Ezek a mikrogliá-szerű sejtek a madár és az egér entericus ganglionjaiban egyaránt előfordulnak (Dora és mtsai 2018).

Az intrinsic neuronális kör polarizáltságának köszönhetően a béllumen tartalma aborálisan egyenirányított (Bayliss és Starling 1901). Az interganglionáris rostok által összekapcsolt, entericus neuronokból és gliákból álló ganglionok a bélfal mentén két koncentrikus gyűrűbe rendeződnek (1. ábra), így a kialakult plexusok a körkörös simaizomréteg két oldalán helyezkednek el. A külső, myentericus (Auerbach) plexus a körkörös és a hosszanti simaizomréteg között, a gasztrointesztinális traktus teljes

hosszában megtalálható, míg a körkörös simaizomréteg lumen felé eső oldalán lévő submucosus plexus [egy külső (Schabadasch) és egy belső (Meissner) komponensből tevődik össze] a nyelőcső területén hiányzik (Timmermans és mtsai 2001). Az érző, motoros és interneuronok alkotta lokális reflexívek szabályozzák a bél motilitását, víz- és ionszekrécióját, a gasztrointesztinális rendszer vérellátását, valamint az epehólyag és a hasnyálmirigy működését (Kirchgeßner és Gershon 1990). Ezek alapján a bélidegrendszer esszenciális szerepe megkérdőjelezhetetlen és nem meglepő, hogy a rendszert érintő veleszületett vagy szerzett elváltozások súlyos egészségügyi következményekkel járhatnak. Az ellátásukkal kapcsolatos egyre növekvő igények kielégítéséhez elengedhetetlen a terápiás lehetőségek folyamatos fejlesztése, melynek háttérét az embrionális fejlődés szélesebb körű ismerete biztosíthatja.



1. ábra: Bélidegrendszer az emlős és a madár vastagbélben. (A) Az entericus neuronok két plexus mentén ganglionokba rendeződnek (zöld). A külső, myentericus plexus a hosszanti és a körkörös izomréteg között található, míg a belső, submucosus plexus a körkörös izomréteg luminális oldalán helyezkedik el (Haneu és Pachnis 2007). (B) 12 napos embrión végzett hármass fluoreszcens jelölés a glia (Brain-fatty acid proteint expresszál, zöld szín) és a neuron (beta-III-tubulint expresszál, piros szín) sejtekből álló plexusok (myentericus és submucosalis) ganglionjait jelöli. Az enterális neuronokat glia sejtek veszik körül. Dapi (kék) sejtmag festés.

2.2. A bélidegrendszer embrionális fejlődése

Az elmúlt néhány évtized során végzett fejlődésbiológiai kutatásoknak köszönhetően számos adat látott napvilágot a bélidegrendszer fejlődésével kapcsolatban. A korai embrionális fejlődés során egy fejlett migrációs kapacitású, multipotens, mesenchymalis eredetű sejtípus, az úgynevezett ganglionléc-eredetű őssejt, epithelio-mesenchymalis átmenet során leválik a záródó velőcső cranialis szakaszának velőredői területéről, valamint a már záródott truncalis velőcsőszakaszcól (Bronner és LeDouarin 2012). A velőcső meghatározott szintjéről származó (cranialis-, cardialis-, vagalis-, truncalis- és sacralis régió) ganglionléc-eredetű sejtek extenzív

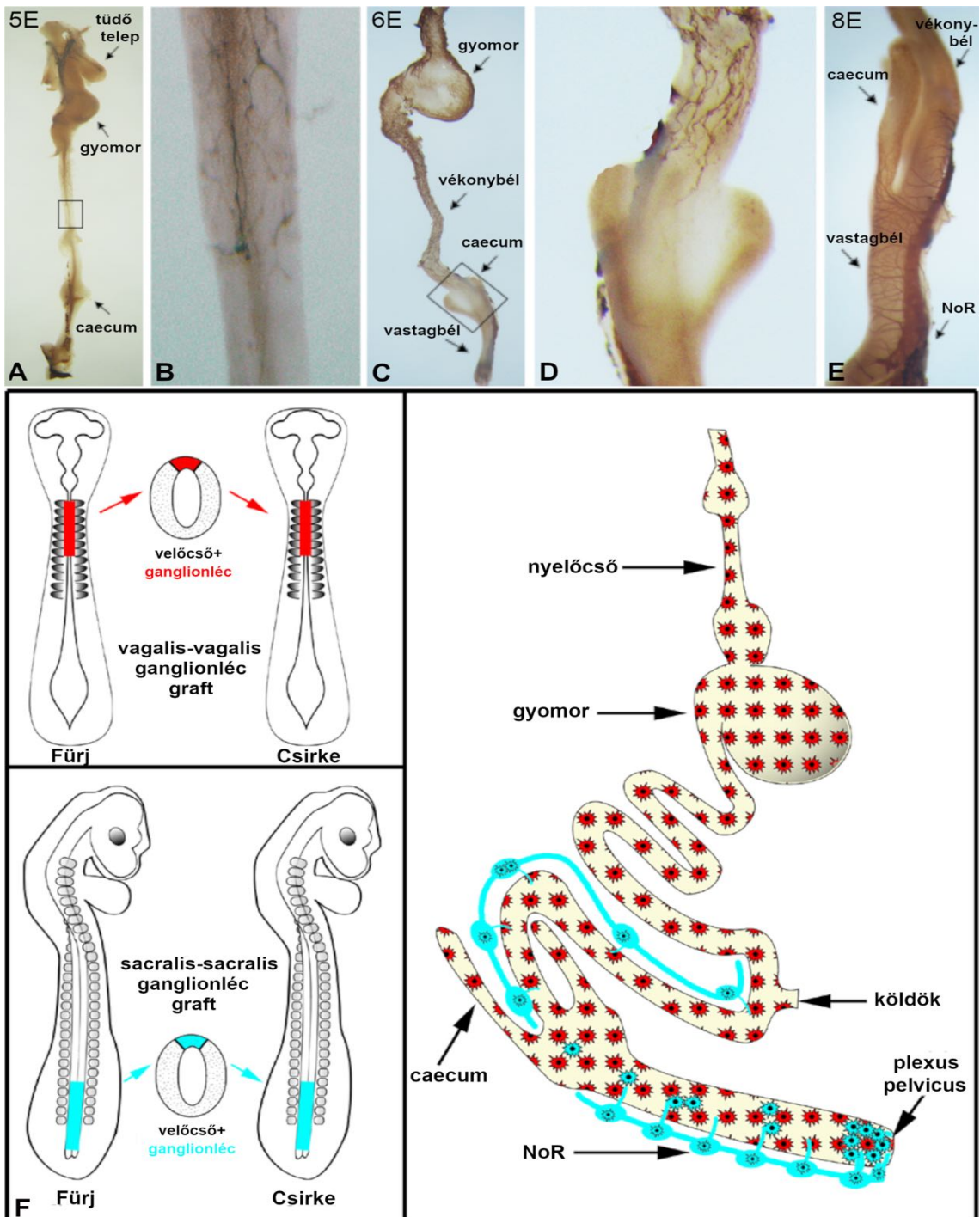
embrionális migrációt folytatnak, mely során nemcsak a bélidegrendszert hozzák létre, hanem különböző szervezdeményeket is kolonizálnak, ahol eltérő sejttípusokká differenciálódnak. A megfelelő molekuláris szignálok hatására képesek a fej kötőszövetévé, endokrin sejtekké, melanocitákká és a perifériás idegrendszer glia és neuron sejtjeivé is átalakulni (Yntema és Hammond 1954, Le Douarin és Teillet 1973, Le Douarin 2004, Hutson és Kirby 2007, Bronner és LeDouarin 2012). A ganglionléc-eredetű sejteket elsőként His írta le madár embrióban, 1868-ban (His 1868, Bronner és Simões-Costa 2016). Ez a rendszer a későbbiekben is az egyik legmegfelelőbb állatmodellnek bizonyult a bélidegrendszer tanulmányozására (Goldstein és Nagy 2008). Yntemana és Hammond 1954-ben csirke embrión végzett kísérletekkel igazolta először a bélidegrendszer és a ganglionléc fejlődéstani kapcsolatát. A kísérlet során mikromanipulációval eltávolították a ganglionléc területét, mely a bélidegrendszer teljes hiányához vezetett. A bélidegrendszer eredetének specifikusabb meghatározására a különböző fajok közti embriómanipulációs kísérletek teremtették meg a lehetőséget. Csirke-fürj velőcső transzplantációs kísérletekkel igazolták először, hogy a bélidegrendszert létrehozó őssejtek a vagalis (1-7 őscsigolya szintje) és a sacralis (28-as őscsigolyától caudalisan) régióból származnak (Burns és mtsai 2002, Nagy és mtsai 2007). A neurulációt követően a ganglionléc-ből származó őssejtek a velőcső dorzális területéről kilépve a bélcső felé vándorolnak, az előbél magasságában belépnek a béltraktusba, majd annak mesenchymájában cranio-caudalis irányban haladnak. A delaminációt követően a vagalis ganglionléc-eredetű sejtek (1-7. őscsigolya magasságából származó ganglionléc-eredetű sejtek) két eltérő útvonal mentén vándorolnak. Az egyik csoport (az első három őscsigolya magasságából indul) a velőcsőtől dorzolateralisan halad, majd a garatíveket és a cardialis régiót kolonizálja. Szintén ebből a magasságból, de néhány órával később egy második populáció is kivándorol, ezek a sejtek a ventrális útvonalat követve a szimpatikus és a hátsó gyökér dúcba, valamint a proximális előbélbe lépnek be, ahol a nyelőcső bélidegrendszerének kialakításában vesznek részt (Kuo és Erickson 2010). A 4-7 őscsigolyák magasságából származó ganglionléc-eredetű sejtek szintén ventrális irányban vándorolnak, csatlakozva az előbélhez tartó migrációs hullámhoz és benépesítik a teljes béltraktust. A truncalis ganglionléc-eredetű sejtek (8-28 őscsigolyák magasságából származó ganglionléc-eredetű sejtek) nem vesznek részt a bélidegrendszer képzésében. A ganglionléc ezen régiójából kivándorló sejtek a dorzális gyökérdúcok láncolatát, a perifériás idegrendszer szimpatikus dúcait, a Schwann-sejteket és a mellékvese

kromafin sejtjeit hozzák létre (melanocyta irányba a ganglionléc minden őssejtje képes differenciálódni) (Kuo és Erickson 2010, Zuhdi és mtsai 2015, Gandhi és Bronner 2018). A vagalis ganglionléc-eredetű sejtek ezen szegmentációs mintázatát csirke-fürj velőcső kiméra és transzgenikus egér kísérletek alapján pontosították: az 1-2 őscsigolya magasságából származó ganglionléc-eredetű sejtek elsősorban a nyelőcső és a gyomor területén jelennek meg, míg a 3-7 őscsigolya magasságából eredő sejtek az egész béltraktus bélidegrendszerének kialakításához hozzájárulnak (Burns és mtsai 2000, Espinosa-Medina és mtsai 2017, Nagy és Goldstein 2017). A ganglionléc-eredetű sejtek vándorlási hulláma a béltraktusban teljes szervi („whole mount”) immuncitokémiai jelöléssel a 2. ábrán látható.

A caudalis helyzetű, sacralis (28-as szomitától caudalisan elhelyezkedő) velőcső szakaszból kilépő ganglionléc-eredetű sejtek ugyancsak hozzájárulnak a bélidegrendszer kialakulásához (2. ábra). Ezek a sejtek először a kloáka körüli mesenchymába lépnek be, ahol a plexus pelvicus ganglionjait képezik, majd folytatják caudo-rostralis irányú vándorlásukat (Burns és mtsai 2000, Nagy és mtsai 2007) és 10-15%-os arányban a vastagbél disztális részének bélidegrendszeréhez járulnak hozzá. Csirke embrióban ez a folyamat az embrionális fejlődés 3. napján (egérben a 9.5-dik embrionális napon) (1. táblázat) veszi kezdetét (Yntema és Hammond 1955, Serbedzija és mtsai 1991, Burns és Douarin 1998, Kapur 2000b, Nagy és mtsai 2012).

Egéren végzett tanulmányok további alternatív útvonalak lehetőségét vetik fel. Az egyik kutatócsoport szerint Schwann sejt prekursorok egy alcsoportja extrinsic idegrostok mentén vándorolva is képes kolonizálni az utóbelet (Uesaka és mtsai 2015). Szintén ez a kutatócsoport felveti egy transmesentericusnak nevezett migrációs útvonal jelenlétét is, melyen keresztül a középbélben található entericus ganglionléc-eredetű sejtek egy része az egér caecumát elkerülve, közvetlenül a mesenteriumon áthaladva lép be a szomszédos utóbél falába (Nishiyama és mtsai 2012).

A ganglionléc-eredetű őssejtek migrációja, osztódása és differenciálódása szimultán zajlik a bélrendszer különböző szakaszaiban. A folyamatok összehangolásában elsősorban a vándorló sejtek és azokat körülvevő szövetek (mesenchyma, endothel, hám) közti kölcsönhatások vesznek részt. Ez a komplex szöveti interakció számos transzkripciós faktor, szignál útvonal és neurotrofikus faktor részvételével zajló, dinamikus fejlődési folyamat.



2. ábra: Bélidegrendszer fejlődése a csirke embrióban. (A, B) 5 napos, (C, D) 6 napos és (E) 8 napos csirke embrió béltraktusának béta-III-tubulinnal (Tuj1) végzett teljes szervi „whole mount” immuncitokémiai festése a vándorló ganglionléc eredetű neurális prekurzorok cranio-caudalis irányú előrehaladását mutatja be (saját preparátum). 5 napos korra a sejtek a gyomor és a vékonybél preumbilicalis szakaszát népesítették be, míg 24 órával később a vándorló sejtek elől haladó, ún. frontvonala a vékony és vastagbél határán a caecumot is elérte. (B) és (D) kép az elől haladó ganglionléc sejtek hálózatát mutatja, (E) 8 napos csirke embrióban a Tuj1 festés már a vastagbél teljes ideghálózatát kirajzolja. A dorzális helyzetű Remak-féle ganglion (NoR), intenzív Tuj1 pozitivitást mutat. (F) Csirke-fürj embriókkal végzett kísérletekkel igazolták először, hogy csaknem a teljes bélidegrendszert a velőcső nyaki szakaszából kivándorló ganglionléc sejtek (1-7 őcsigolya magassága; vagal neural crest; piros szín) hozzák létre. A velőcső caudalis szakaszából (28. őcsigolyától caudalisan; sacral-neural crest; kék szín) kivándorló sejtek a rectum és részben a vastagbél idegrendszerének kialakulásához járulnak hozzá (Goldstein és Nagy 2008). NoR, Remak ideg

1. táblázat: A bélidegrendszer embrionális fejlődésének összehasonlítás: a vagalis ganglionléc-eredetű sejtek megjelenésének időpontja, fajok szerinti bontásban (Nagy és Goldstein 2017). *hpf, fertilizációt követő órák száma; E, embrionális nap*

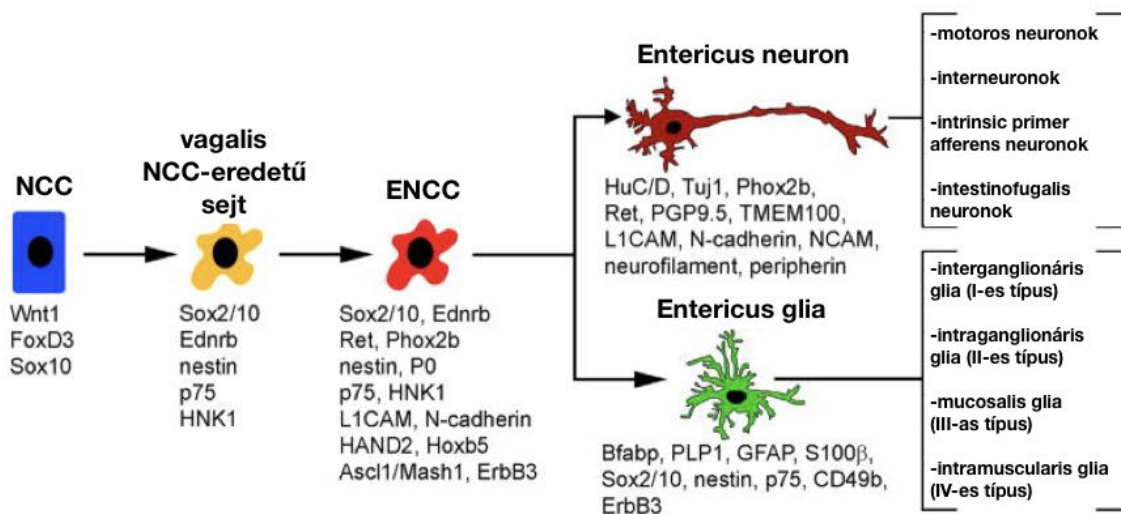
| | Proximális előbél | Gyomor | Caecum | Disztális utóbél |
|-----------------|-------------------|--------|--------|------------------|
| Zebrahal | 32 óra | - | - | 66 óra |
| Fürj | E2.5 | E4 | E5 | E7 |
| Csirke | E2.5 | E4.5 | E5.5 | E8 |
| Egér | E9.5 | E10.5 | E11.5 | E14.5 |
| Humán | 3. hét | 4. hét | 6. hét | 7. hét |

A vándorló ganglionléc-eredetű sejtek madarakban és rágcsálókban is véletlenszerűen oszlanak el a még differenciálatlan simaizmot tartalmazó elő- és középbél mesenchymájában (Allan és Newgreen 1980, Kapur és mtsai 1992, Burns és Douarin 1998, Young és Newgreen 2001, Wallace és Burns 2005). A körkörös simaizom differenciálódása a frontvonalbeli sejtek caecum felé haladásával egy időben veszi kezdetét. Ennek következtében az entericus ganglionléc-eredetű sejtek kiszorulnak a bélfal legkülső rétegébe, a simaizom és a serosa közé, így később itt alakulnak ki a myentericus ganglionok (Bourret és mtsai 2017, Graham és mtsai 2017).

A ganglionléc-eredetű sejtek bélfalban történő vándorlásának irányításában a bélcsatornában található kapilláris hálózat endothel sejtjei is részt vesznek. A ganglionléc-eredetű sejtek felszínükön számos sejtadhéziós molekulát expresszálnak (Nagy és mtsai 2009, Nagy és mtsai 2012), ilyen például a béta-1 integrin, amely közvetítésével a vándorló sejtek a mesenchymában futó erek bazális membránjában található lamininhez és fibronektinhez tudnak kötődni (Nagy és mtsai 2009). Madárban a laminint expresszáló endothel sejtek még a ganglionléc-eredetű sejtek megjelenése előtt két koncentrikus kapilláris hálózatot alkotnak, mely előre meghatározza a későbbiekben ide érkező entericus ganglionléc-eredetű sejtek pozícióját (Nagy és mtsai 2009). Emlősökben a középbél szakaszán elhelyezkedő myentericus ganglionléc-eredetű sejteknek megkülönböztetünk egy második migrációs hullámát is, mely során a külső, myentericus plexus területén található sejtek sugár irányban vándorolnak az epithelium felé, kolonizálva ezzel a submucosa területét is, ahol végül létrejön a submucosalis plexus (Uesaka és mtsai 2013) és kialakul a bélrendszer jellegzetes

radiális mintázata. Egér és patkány colorectumában található submucosalis plexus csak a születést követően alakul ki (McKeown és mtsai 2001). Ezzel szemben a madár colorectumának bélidegrendszerében előbb a submucosalis plexus fejlődik ki és csak ezt követi a myentericus plexus kialakulása (Nagy és Goldstein 2006b, Nagy és mtsai 2012).

A ganglionléc-eredetű sejtek migrációjának egyik legkritikusabb pontja a velőcsőből előbélbe történő vándorlás folyamata. Ennek irányításában kiemelt szerepet tulajdonítanak a paraxiális mesoderma által lokálisan termelt retinsavnak és a vándorló ganglionléc-eredetű sejteken található retinsav receptor kapcsolatának. A receptor-ligand kölcsönhatás a bélidegrendszer fejlődése szempontjából egyik legszükségesebb fehérje, a tirozin-kináz receptor (Ret) expresszióját eredményezi (Cui és mtsai 2003, Yamada és mtsai 2007, Fu és mtsai 2010, Simkin és mtsai 2013). Ennek alapján a Ret+ ganglionléc-eredetű sejteket előbélbe lépésük pillanatától kezdve entericus ganglionléc-eredetű sejteknek (ENCC) nevezhetjük. Ezeknek a sejteknek a vándorlási sebessége több esetben is meghatározásra került: madarakban és egerekben ez körülbelül 40 µm/óra (Allan és Newgreen 1980, Young és mtsai 2014).



3. ábra: Az enterális neuronok és glia sejtek differenciálódása. Nagy N. és Goldstein A. M. ábrája nyomán módosítva (Nagy és Goldstein 2017).

2.3. A bélidegrendszer fejlődésének molekuláris szabályozása

A funkcionális szempontból jól működő idegsejt hálózat kialakulása függ a proliferációtól, a sejtüléléstől, az irányított migrációtól, a sejtek neuron és glia irányú elköteleződésétől és differenciálódásától, az axonok kialakulásától, a koncentrikus plexusokat alkotó ganglionok létrejöttétől, valamint a szinapszisképzéstől. Ennek az

összehangolt, komplex folyamatnak az irányításában számos transzkripciós faktor, sejtfelszíni receptor és neurotrofikus szignál vesz részt. A térben és időben szigorúan szabályozott folyamatoknak köszönhetően egyazon időpontban az embrionális bél disztális szakaszán található frontvonalbeli entericus ganglionléc-eredetű sejtek még proliferatívák és invazívák, a mögöttük vándorlók egy része ekkorra befejezi migrációját és differenciálódni kezd, a még proximálisabban elhelyezkedő sejtek pedig már ganglionokba rendeződnek és axon kiterjesztésük is megindul.

Young és munkatársai megfigyelései szerint az izolált entericus ganglionléc-eredetű sejtek nem vándorolnak olyan gyorsan és célzottan, mint az egymással összekapcsolódva vándorló sejtek, ezért az irányított sejt migráció egyik feltételeként az elől haladó entericus ganglionléc-eredetű sejtek megfelelő sejt sűrűségét jelölték meg (Young és mtsai 2004, Barlow és mtsai 2008). Hipotézisüket a sejt-sejt kapcsolatokat fenntartó L1 sejtadhéziós molekula (L1CAM) mutációja kapcsán végzett vizsgálatok is megerősítik. Ha a sejtek közötti L1CAM mediált molekuláris kapcsolat intenzitása csökkent, Hirschsprung-kórhoz hasonló fenotípus alakult ki (Okamoto és mtsai 2004, Anderson és mtsai 2006b).

2.3.1. Mesenchymalis faktorok

A bélidegrendszer fejlődésében szerepet játszó folyamatok szabályozása elsősorban az entericus ganglionléc-eredetű sejtek által expresszált intrinsic faktoroktól, valamint a mesenchymalis mikro környezet közti molekuláris kölcsönhatásoktól függ. A bélidegrendszer fejlődésének molekuláris szabályozásában az egyik legfontosabb jelátviteli folyamatot a neurotrofikus faktorok családjába tartozó, glia eredetű GDNF aktiválja. Ez a ligand a sejtmembránban található GFR α 1 koreceptorból és a Ret tirozin-kináz transzmembrán receptorból álló komplexhez kötődik. A ganglionléc-eredetű sejtek előbélbe lépésének idején a bélmesenchyma már termeli a GDNF-et, a vándorló sejtek felszínén pedig Ret/GFR fejeződik ki. A mesenchymában termelődő kemoattraktáns hatású GDNF kezdetben a gyomor, a caecum és a kloáka területén koncentrálódik, mely a bélmesenchyma koncentráció gradiens mentén végbemenő kolonizációjának lehetőségét veti fel. Ezt azon *in vitro* kísérletek eredményei is alátámasztják, ahol kollagén gélbe helyezett embrionális béldarabból GDNF hatására intenzív ganglionléc-eredetű sejt kivándorlás figyelhető meg (Fu és mtsai 2004, Nagy és Goldstein 2006a, Mwiszerwa és mtsai 2011). A GDNF kötődésekor bekövetkező Ret

foszforiláció a RAS/mitogén aktiválta protein kináz (MAPK), a Jun asszociált N-terminál kináz (JNK), valamint a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) útvonalakat aktiválja (Asai és mtsai 2006). A GDNF-GFRalpha1-Ret szignálút vonal esszenciális a ganglionléc-eredetű sejtek túlélése, proliferációja, migrációja és differenciációja szempontjából. Továbbá a GDNF általi Ret aktiváció a második, radiális irányú vándorláshoz is elengedhetetlen (Uesaka és mtsai 2013). A szignál út vonal neuronális differenciálódásban betöltött szerepét *in vitro* körülmények között igazolták (Chalazonitis és mtsai 1998, Hearn és mtsai 1998). A ganglionléc-eredetű sejtek proliferációjára kifejtett hatását pedig a Ret szignálút vonal negatív regulátorának inaktiválódása, valamint a GDNF elérhetőségének fokozódása kapcsán egyaránt kialakuló enterális neuron szám növekedés támasztja alá. A GDNF növekedési faktor család másik tagja a Neurturin (NRTN), mely a GFRalpha2-höz kötődve szintén a Ret szignálút vonalat aktiválja.

Az ugyancsak mesenchymalis eredetű ET-3 növekedési faktor (21 aminosavból álló peptid) a ganglionléc-eredetű sejteken található endothelin receptor B (EdnrB) G-protein kapcsolt receptor komplexén keresztül a GDNF serkentő hatását modulálja. Az ET-3 kompenzálja a GDNF kemoattraktáns hatását, fokozza a ganglionléc-eredetű sejtek proliferációját, illetve lassítja a differenciálódást, ami fenntartja a sejteket egy elkötelezetlen, proliferatívabb stádiumban (Nagy és Goldstein 2006a, Goldstein és Nagy 2008). Mindezt az entericus ganglionléc-eredetű sejtek GDNF által indukált proliferációjának szinergista fokozásával (Barlow és mtsai 2003) és neuronális differenciálódásra kifejtett hatásának ellensúlyozásával (a GDNF növeli a neuronok számát, az ET-3 pedig csökkenti) (Hearn és mtsai 1998) valósítja meg. A két út vonal egyensúlya hozzájárul a bélidegrendszer tér-időben szinkronizált fejlődéséhez.

2.3.2. *Transzkripciós faktorok*

A növekedési faktorok mellett a bélidegrendszer fiziológiás (és patológiás) fejlődését számos transzkripciós faktor is szabályozza. A Sox10 (SRY-related HMG-box 10) transzkripciós faktor esszenciális a bélidegrendszer fejlődéséhez, szükséges a Ret, az EdnrB és a Phox2b (paired-like homeobox 2b) molekulák ganglionléc-eredetű sejteken történő zavartalan expressziójához és ez által részt vesz a sejtek multipotenciáljának fenntartásában is (Lang és mtsai 2000, Zhu és mtsai 2004). A Sox10 transzkripciós faktort már a velőcsőről lehasadó ganglionléc sejtek is

expresszálják, amit a bél falban vándorló entericus ganglionléc-eredetű sejtek tovább folytatnak. Később a neuron irányba differenciálódó ganglionléc-eredetű sejtekben az expressziója fokozatosan lecsökken és csak a glia irányban elkötelezett sejteken marad meg (Lake és Heuckeroth 2013, Mckeown és mtsai 2013). A Sox10 elengedhetetlen a ganglionléc-eredetű sejtek túléléséhez, valamint az EdnrB-hez hasonlóan az entericus ganglionléc-eredetű sejtek differenciálatlan állapotának és proliferatív stádiumának fenntartásához is szükséges (Paratore és mtsai 2002, Bondurand és mtsai 2006, Nagashimada és mtsai 2012). A paired-like homeobox 2b (PHOX2B) transzkripciósi faktort a bél mesenchymájába lépő ganglionléc-eredetű sejtek kezdik el kifejezni (Anderson és mtsai 2006a). A Phox2b szükséges az entericus ganglionléc-eredetű sejtek proliferációjához, túléléséhez és a Sox10-el együtt a Ret megfelelő expressziójához is (Pattyn és mtsai 1999). Kezdetben a differenciálatlan entericus ganglionléc-eredetű sejtek expresszálják, majd a glia irányba elkötelezett sejtekben fokozatosan lecsökken és csak a neuron irányba differenciálódó sejteken fejeződik ki (Sasselli és mtsai 2012). A mammalian achaetescute homolog 1 (Mash1/Ascl1) egy basic helix-loop-helix DNS kötő fehérje, mely szintén az előbélbe érkező entericus ganglionléc-eredetű sejteken található meg. A Mash1 normál körülmények között gátolja a Sox10 expressziót, ezért a két faktor egyensúlya nélkülözhetetlen szerepet játszik a progenitor állapot, a differenciálódás és a neurogenesis egyensúlyának fenntartásában (Kim és mtsai 2003).

2.3.3. Epithelialis faktorok

A ganglionléc-eredetű sejtek vándorlása kapcsán korábban részletezett mesenchymalis faktorokon kívül a bélepitheliumból származó fehérjék esszenciális szerepére utaló adatok is ismertek. Míg ezek egyikéről, a ganglionléc-eredetű sejtekre kemoattraktáns hatást gyakorló Netrinről viszonylag többet tudunk, addig a másik ugyancsak hám eredetű Hedgehog fehérje családról kevesebb információval rendelkezünk.

A netrinek 600 aminosavból álló, konzervált, szekréciós proteinek (Dickson és Keleman 2002), melyek részt vesznek az axonok irányításában és a neuroblastok migrációjában. Hatásukat a ganglionléc-eredetű sejtek felszínén található UNC5 és DCC (deleted in colorectal cancer) receptoron keresztül fejtik ki. A netrin molekulák négy típusát különböztetjük meg: egérben netrin 1 és 3, csirkében netrin 2 fordul elő (Seaman és mtsai 2001). Ezeket mindkét fajban a bél epitheliuma expresszálja. Míg az

UNC5 receptoron keresztül gátló, addig a DCC receptoron keresztül kemoattraktáns hatásuk érvényesül. A sejtek myentericusból submucosalis régióba vándorlása többek között a netrin ez utóbbi sajátságának is köszönhető, amit a DCC hiányos egereknél megfigyelt, submucosalis ganglionokat nélkülöző fenotípus kialakulása is alátámaszt (Jiang és mtsai 2003). Annak ellenére, hogy az epithelialis sejtek kemoattraktáns hatású netrint expresszálnak a ganglionléc-eredetű sejtek mégsem a mucosában vándorolnak, hanem a körkörös simaizomréteg belső oldala mentén rendeződnek ganglionokba. Ennek hátterében olyan gátló faktorok és ECM komponensek jelenléte valószínűsíthető, melyek együttese a mucosalis régió kolonizálását akadályozza meg. Az egyik ilyen molekula feltehetőleg a Hedgehog családba tartozó, Sonic hedgehog növekedési faktor (Shh).

A Hedgehog (Hh) fehérjék családjába összesen három morfogén a Sonic hedgehog (Shh), az Indian hedgehog (Ihh) és a Desert hedgehog (Dhh) tartozik. Ezeket a diffúzibilis Hh morfogéneket a bél epitheliuma már az intesztinális organogenezis legkorábbi stádiumától kezdve termeli (Ramalho-Santos és mtsai 2000, Sukegawa és mtsai 2000, Kolterud és mtsai 2009). A Shh az embrionális fejlődés kezdetén a gerincvelő alaplemezában és a gerinchúrban is azonosítható, később viszont a végtagbimbókban, a bélcső entodermájában, az agyhólyagokban, a tüdőben és a fejlődő nemiszervekben is megjelenik. A Shh fontos szerepet játszik a végtagok antero-posterior és a gerinchúr dorzoventrális mintázatának meghatározásában, a mesenchyma proliferációjának és differenciációjának szabályozásában, valamint a bélfal radiális tengely menti koncentrikus elrendeződésének kialakulásában (Roberts 2000, Sukegawa és mtsai 2000). Mutációjának leggyakoribb fenotípusai közé a rendellenes koponya, a csigolyák hiánya, a rövidebb ujjpercek, a nyelőcső sipolyok és a kloáka malformáció tartozik. Jelátvittele a Patched (Ptc) nevű receptorához kötődésével veszi kezdetét. Ez "alapállapotában" (Hh fehérje kötődésének hiányában) egy másik Smoothened (Smo) nevű transzmembrán receptorhoz kapcsolódik, mely következtében gátló hatású molekuláris kölcsönhatás érvényesül. Ligand bekötődésekor e két receptor kapcsolata felbomlik, így a gátlás megszűnik, az ennek kapcsán aktívvá váló Smo pedig beindítja a szignál transzdukciós kaszkádot, minek végeredménye a Gli fehérjecsaládba tartozó transzkripciós faktorok sejtmagi transzlokációja. A Hh jelátvitel direkt módon szabályozza a bone morphogenetic protein 4 (BMP4) mesenchymalis expresszióját. Ez a fehérje a bélidegrendszer prekursorain található receptorain keresztül fokozza a sejtek

osztódását és vándorlását. A BMP4 negatív szabályozásáért a mesenchymalis sejtek által szekretált Noggin fehérje felelős (Goldstein és mtsai 2005).

Fu és munkatársai egér embrión végzett kísérletei alapján a Shh képes módosítani a ganglionléc-eredetű sejtek GDNF-fel szembeni érzékenységét (Fu és mtsai 2004). Ezen kívül serkenti a ganglionléc-eredetű sejtek proliferációját, gátolja a neuronok differenciálódását és megakadályozza a ganglionléc-eredetű sejtek submucosára eső mesenchymába történő migrációját. Ez utóbbival a formálódó submucosalis plexus radiális helyzetének meghatározásához is hozzájárul. Az Shh célzott mutációjakor a ganglionléc-eredetű sejtek ugyan kolonizálják a belet, de a megnövekedett mennyiségű enterális neuron rendezetlenül, a hám alatti mesenchymában is előforduló ektopikus ganglionokat alkot (Ramalho-Santos és mtsai 2000). Rágcsálókban az Ihh gén mutációja szegmentális aganglionózishoz vezet (Ramalho-Santos és mtsai 2000), de a fehérje bélidegrendszer fejlődésében betöltött szerepe még nem teljesen tisztázott. A Gli transzkripciós faktort érintő zavarokban hasonló fenotípus figyelhető meg. A Shh receptorok különböző modell rendszerekben végzett expressziós vizsgálata ellentmondásos eredményekhez vezetett. Az egér embrió immunhisztokémiai vizsgálata (Fu és mtsai 2004) és a zebradánió Ptc1 transzkripciója alapján az entericus ganglionléc-eredetű sejtek kifejezik a gént (Reichenbach és mtsai 2008). Ezt a zebrahal Ptc1 morfolínóval előidézett funkció-vesztéses mutációja során kialakult bélidegrendszer hiányos fenotípus is alátámasztotta. Azonban Kolterud és munkatársai transzgenikus egereken végzett expressziós analízise alapján a korai embrionális bélidegrendszer sejtjei nem fejeznek ki Shh receptort (Kolterud és mtsai 2009). A kérdés eldöntése egyre sürgetőbbé vált mióta genome-wide asszociációs tanulmányokkal humán Hirschsprung-kór mintákban is azonosították a Ptc1 és Gli gének mutációját (Ngan és mtsai 2011).

2.4. A bélidegrendszer fejlődését és funkcióját érintő kórképek

A ganglionléc-eredetű sejtek fejlődésében bekövetkezett hibákat veleszületett neurocristopathiáknak nevezzük (Bolande 1974, Bolande 1997, Etchevers és mtsai 2006). Ezeket két fő csoportra oszthatjuk, az egyikbe azokat a defektusokat soroljuk, melyeknek háttérében a ganglionléc-eredetű sejtek migrációjának vagy morfogenezisének a zavara áll, mint például a Hirschsprung-betegség, az aorticopulmonalis septum defektus és a Di George szindróma. A másik fő csoportba

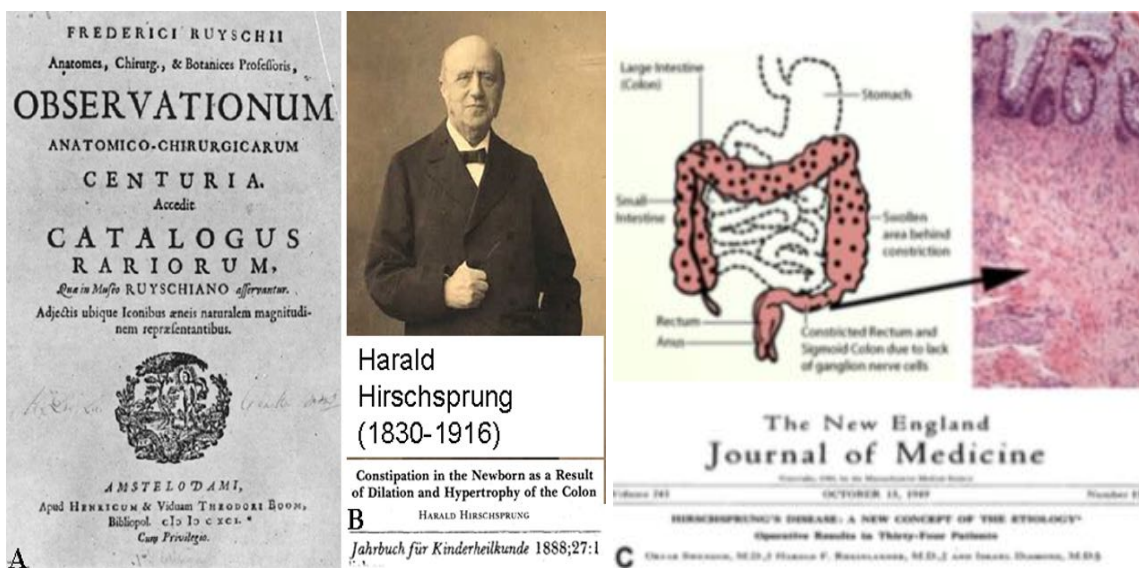
pedig a tumorok és a proliferációs zavarok tartoznak (neurofibromatosis, pheochromocytoma, neuroblastoma és ganglioneuromatosis). A neurointesztinális kórképek eredetüket tekintve veleszületett vagy szerzett megbetegedések lehetnek. A neurointesztinális betegségek etiológiája magában foglalja a genetikai, gyulladós, degeneratív és paraneoplasztikus folyamatokat (Burns és mtsai 2016). A humán bélidegrendszer fejlődési rendellenességeit a neuronok számbeli vagy differenciáltságbeli eltérései alapján csoportosíthatjuk. A neuron szám elváltozása alapján osztályozott betegségek az alábbiak: hiperganglionózis: ganglioneuroma, IND; hipoganglionózis: intesztinális pszeudo-obstrukció; aganglionózis: Hirschsprung-kór (Kapur 2000a).

2.4.1. Hirschsprung-kór

A Hirschsprung-kór a bélidegrendszert érintő fejlődési rendellenességek közül az egyik legjobban karakterizált betegség. Ez a veleszületett elsősorban a vastagbél idegrendszerét érintő elváltozás emberben 1:5000 arányban fordul elő. A betegséget a kórkép első leírójáról, Harald Hirschsprung, dán gyermekgyógyásról nevezték el. Eredeti közleményében két olyan, egymástól független esetet mutat be, melyekben egy-egy fiú életét vesztette. A klinikai képet mindkét esetben hasi disztenzió, veleszületett megacolon és krónikus székrekedés uralta. Tanulmánya 1887-ben jelent meg a "Gesellschaft für Kinderheilkunde-Berlin" folyóiratban. Tudománytörténeti érdekesség, hogy a megacolon jelenségét valójában Frederik Ruysch (holland anatómus) figyelte meg elsőként. Munkája az *Observationum Anatomici-chirurgicarum Centuria*-ban jelent meg 1691-ben (Leenders és Sieber 1970). A betegség korai leírása ellenére, maga az etiológiája egészen az 1950-es évekig tisztázatlan volt. 1949-ben a bostoni Harvard Egyetemen sebészként dolgozó Orvar Swenson ismerte fel, hogy a betegség hátterében nem a rendellenesen kitágult vastagbél, hanem a megacolon szakasz alatt, a belső anális sphincter felett lévő, születés előtt kialakuló aganglionáris szegment áll. A disztális helyzetű ganglionok hiánya következtében tónusos kontrakció alakul ki majd a szűkület feletti szakasz következményesen kitágul (Swenson és mtsai 1949, Kapur 2000a, Skaba 2007).

A megbetegedés 75-80%-ban a rektumra és a szigmabélre korlátozódik (short-segment HD) és csak 8%-ban érinti a teljes bélszakaszt. Leggyakrabban sporadikus megjelenésű, de előfordulnak nem-Mendeli, multifaktoriális öröklődést mutató esetek is. A nemek közti arány 4:1 férfi túlsúlyt mutat. 70%-ban izolált formában jelenik meg,

ugyanakkor előfordul egyéb születési rendellenesség részeként is (21-es triszómia, Shah-Wardenburg szindróma, Haddad szindróma, Mowat-Wilson szindróma). A Hirschsprung-kór a submucosalis és a myentericus plexusban található entericus ganglionok hiányával karakterizálható, mely a disztális bélszakaszt változatos mértékben érintheti. Fő jellemzője a motilitás zavara, ezt legtöbbször a születés után 48 órán belül diagnosztizálják. Legfőbb tünetei a passzázsavar, tágult has, epés hányás és az enterocolitis (Heanue és Pachnis 2007). Jelenleg a Hirschsprung-kór enyhébb eseteiben konzervatív terápiát alkalmaznak, míg a súlyosabb esetek kezelési protokollja legtöbbször az aganglionotikus bélszakasz sebészi eltávolításából áll, ugyanakkor az utóbbi időben számos kutatócsoport összpontosít az összejtterápiában rejlő lehetőségekre is. A Hirschsprung-kórra jellemző aganglionózis gyakran társul egyéb bélidegrendszeri hibákkal, mint a neuronok hiperpláziája, ektopikus ganglionok, hipoganglionózis, neuron degeneráció.



4. ábra: A Hirschsprung-kór felfedezésének történeti áttekintése. (A) F. Ruysch 1691-ben megjelent könyvének címlapja, melyben elsőként került leírásra a kongenitális megacolon szindróma. (B) Harald Hirschsprung portréja és a megacolonról leíró publikáció fejléce. (C) Orvar Swenson 1949-ben elsőként ismerte fel, hogy a Hirschsprung-kór elsődleges okát a disztális colorectum idegrendszerének hiánya jelenti. Swenson végezte el először az aganglionotikus bélszakasz eltávolítását, aminek köszönhetően a beteg meggyógyult (Swenson és mtsai 1949).

2.4.2. A Hirschsprung-kórhoz asszociált bélidegrendszeri betegségek

Intesztinális Neuronális Diszplázia (IND): Az Intesztinális Neuronális Diszplázia B típusa csecsemő vagy késő gyermekkorban, súlyos székrekedés tünetével jelentkezik. Legtöbbször izoláltan vagy Hirschsprung-kórhoz asszociáltan (az aganglionotikus szegmensétől proximálisan) fordul elő (Kobayashi és mtsai 1995). A submucosalis plexus neuronális hiperpláziája mellett a lamina propriában megjelenő ektopikus ganglionok jellemzik (Meier-Ruge és mtsai 1995, Kapur 2001). A diagnózis csak abban az esetben helytálló, ha a hisztológiai elváltozások kiterjednek a vastagbél területére is. Kezelése legtöbbször konzervatív, sebészi beavatkozás csak a legsúlyosabb esetekben jön számításba. Madár embrióban a Shh jelátvitel gátlásának hatására, az intesztinális neuronális diszpláziában megfigyeltekhez nagyon hasonló morfológiájú, nagy és ektopikus submucosalis ganglionok alakultak ki. A hasonlóság felveti a növekedési faktor patogenezisben betöltött szerepének lehetőségét.

Ganglioneuromatózis a MEN2B szindrómában: A MEN2B ritka, 1:30000 arányban előforduló, autoszómális domináns öröklődésű szindróma. Kialakulásában a RET gént érintő mutációk patogenetikai szerepet játszanak. Vezető kórképe a medulláris thyroid carcinoma korai kezdetű, agresszív formája, melyhez pheochromocytoma és marfanoid testalkat társulhat. A gasztrointesztinális tünetek, mint székrekedés, megacolon vagy a krónikus intesztinális pseudo-obstrukció (CIPO) már csecsemő vagy kora gyermekkorban megjelennek (a betegek 80%-ában). Diffúz ganglioneuromatózis az esetek kb. 40%-ban alakul ki (Wray és mtsai 2008).

2.4.3. Egyéb bélidegrendszert érintő veleszületett és szerzett rendellenességek

Nyelőcső achalasia: A nyelőcső ritka betegségei között számontartott achalasia primer motilitási zavarral, regurgitációval, mellkasi fájdalommal, respiratorikus komplikációkkal és súlyvesztéssel járó neuromuszkuláris működési zavar. A nyelőcső hipomotilitása, valamint az alsó esophagealis sphincter (LES) hipertenzív, relaxációra képtelen állapota jellemzi. Kórélettani alapját a myentericus plexus sejtjeinek hiányából vagy degeneratív elváltozásaiból adódó következményes sphincter denerváció képezi. Az intrinsic gátló neuronok zavara jellemzi, melyek egészséges körülmények között a nyelőcső és a LES területén nitrogén-oxidot (NO) és vazóaktív intesztinális polipeptidet (VIP) bocsájtanak ki (Hoshino és mtsai 2013). A neuropátia etiopatogenezisét több evidencia is alátámasztja (Gyawali 2016). Valószínűleg a fertőző ágensek, közülük is

elsősorban a vírusok immunválaszt indítanak be a nyelőcső myentericus neuronjai ellen. Több tanulmány azonban azt feltételezi, hogy az immunmediált neuron károsodást a keringő autoantitestek okozzák (Verne és mtsai 1997, Eaker 1998). Az achalasia olyan ritka szindrómákban is előfordul, mint a familiáris nyelőcső achalasia, az achalasia microcephal szindróma és az Allgrove szindróma. Jelenleg farmakológiai (nitrát, foszfodiészteráz-5 gátlók, kalciumcsatorna- blokkolók és botulinium direkt injektálása), sebészi (miotómiás) és pneumatikus dilatációs kezelés jelenti a terápiát.

Gasztroparézis: A rendellenességet a szilárd és a folyékony táplálék gyomorból történő ürülésének késése jellemzi. A szimptomás gasztroparézist hányinger, hányás, puffadás, korai jóllakottság és epigasztrikus fájdalom kíséri. Felnőtt korban két formája fordul elő az idiopátiás (az esetek 50%-a) és a diabéteszes gasztroparézis (Horowitz és Fraser 1995, Patrick és Epstein 2008). Gyermekeknél az esetek 70%-a idiopátiás, a többi gyógyszer, vírusfertőzés vagy sebészi beavatkozás indukálta. A nem idiopátiás kórforma patofiziológiájában a gyomor extrinsic idegi ellátásában bekövetkező változás játssza a legfőbb szerepet. Bár az idiopátiás gasztroparézis patogenezise jórészt ismeretlen, mégis valószínűnek tűnik, hogy az intrinsic beidegzés zavara hozzájárul kialakulásához (You és mtsai 1981, Shellito és Warshaw 1984). A gasztroparézises betegek biopsziás mintáinak szövettani elemzése során hipoganglionózist, a Cajal-féle intesztinális sejtek (ICC) hiányát és az idegi nitric oxid szintázt (nNOS) expresszáló sejtek számának csökkenését figyelték meg (Grover és mtsai 2012). Az elváltozás a myentericus és az intramuscularis ICC-eket egyaránt érintheti, néhány esetben pedig myentericus ganglionitist is leírtak. Az nNOS hiányos egér modellben a humán neuropátiához hasonlóan gasztroparézis és disztális aganglionózis figyelhető meg. A leghatékonyabb kezelési stratégia az étkezési szokások megváltoztatása és prokinetikus szerek alkalmazása. A gyógyszeres kezelésre nem reagáló, refrakter esetekben jelenleg a sebészi megközelítés jelenthet valós alternatívát.

Idiopátiás hipertrófiás pylorus sztenózis (IHPS): Az IHPS-t a gyomor elégtelen ürülése jellemezi. A megbetegedés 1:500 arányban fordul elő és jellemzően 1 hónapos korban jelentkezik először. A pylorus régió myentericus ganglionjainak nNOS hiánya jellemzi (Vanderwinden és mtsai 1992). Az inhibitoros denerváció eredményeként kialakuló folyamatos tónusos kontrakció és következményes izom hipertrófia meggátolja a gyomor megfelelő ürülését. Sporadikusan és egyéb betegségekhez asszociáltan (Turner-szindróma, 18-as triszómia, fenilketonúria) is előfordulhat (Goyal

és Hirano 1996). Jelenleg a sebészi beavatkozás az egyetlen eredményre vezető terápiás lehetőség.

2.5. A bélidegrendszer rendellenességeinek hátterében álló molekuláris mechanizmusok

A veleszületett bélidegrendszeri hibák hátterében legtöbbször a ganglionléc-eredetű sejtre specifikus transzkripciós faktorok, adhéziós molekulák vagy az embrionális bél szöveteiben termelődő növekedési faktorok, morfogének génmutációja állhat. A bélidegrendszert érintő megbetegedések, köztük kiemelten a Hirschsprung-kór hátterében bizonyítottan fontos szerepük van a béltraktusban termelődő mesenchymalis és epithelialis növekedési faktoroknak.

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 található Ret-receptorának, valamint a szintén mesenchymalis Endothelin-3-nak (ET-3) és receptorának (EdnrB) mutációja áll (Heanue és Pachnis 2007, Obermayr és mtsai 2013). Ezek közül a Ret-et kódoló gén mutációját a familiáris Hirschsprung-kór esetek körülbelül felében, míg a sporadikus esetek majd 1/3-ban kimutatták és szinte az összes többi esetben is leírtak nem kódoló Ret variánst. Ezen mutációk következménye a receptorexpresszió szignifikáns csökkenése (Hofstra és mtsai 2000, Amiel és Lyonnet 2001, Emison és mtsai 2005, Goldstein és mtsai 2013). Mivel a retinsav jelátvittele képes indukálni a Ret expressziót és fenntartani a foszfatidil-inozitol-3-kináz aktivitást, ezért az elmúlt évek során egyre nagyobb hangsúlyt fektettek az A-vitamin hiány Hirschsprung-kórban betöltött szerepének tanulmányozására is (Yamada és mtsai 2007, Fu és mtsai 2010, Simkin és mtsai 2013). A GDNF növekedési faktor család másik tagja a Neurturin (NRTN) a GFRalpha2-höz kötődve szintén a Ret szignálútvonalat aktiválja. Mutációját igazolták Hirschsprung-kórban szenvedő betegeknél, de esetükben nem a myentericus neuronok száma változik meg, hanem az excitátoros idegrostok denzitása csökken le. Bár a Ret mutáció a betegség egyik fő rizikófaktora, az evidenciák alapján mégis azt feltételezik, hogy ez önmagában nem minden esetben okoz aganglionosist (Goldstein és mtsai 2013). Az esetek többsége multigénnek tűnik (Carrasquillo és mtsai 2002, Cantrell és mtsai 2004).

A szintén mesenchymalis eredetű ET-3 növekedési faktor, a ganglionléc-eredetű sejteken található receptor komplexén (endothelin receptor B-EdnrB) keresztül a GDNF fentebb részletezett serkentő hatását modulálja. A két útvonal egyensúlya hozzájárul a bélidegrendszer térben-időben szinkronizált fejlődéséhez. Érdekes módon a caecum eléréséig az entericus ganglionléc-eredetű sejteknek nincs feltétlenül szükségük az EdnrB jelátvitelre (Druckenbrod és Epstein 2005). Ez megmagyarázza, hogy a szignál útvonal hibája miatt kifejezetten a colorectumra lokalizált aganglionózist okoz. Mutációját nem csak Hirschsprung-kórban, hanem a veleszületett süketességgel és melanocita rendellenességgel is társuló Shah-Waardenburg szindrómában is azonosították (Baynash és mtsai 1994, Hosoda és mtsai 1994). A szindróma fenotípusának hátterében a jelátviteli útvonal melanocita fejlődésben betöltött szerepe áll. A 2. táblázatban összefoglalva láthatjuk, melyek azok a gének és növekedési faktorok, illetve azok receptorai, amelyek felelősek lehetnek a bélidegrendszer fejlődési hibáiért.

A morfogénekből bekövetkező mutációkon kívül a vándorló bélidegrendszeri sejtek genetikai programjában bekövetkező hibák is felelősek lehetnek a Hirschsprung-kór kialakulásáért. A bélidegrendszert érintő veleszületett fejlődési rendellenességek patomechanizmusában számos, a bélidegrendszer fejlődése szempontjából nélkülözhetetlen transzkripciós faktor (Sox10, Phox2b, PAX3, HOX11L1, HAND2, Mash1 és a ZEB2) mutációja is szerepet játszik. A Sox10 transzkripciós faktor homozigóta nullmutációja teljes aganglionózishoz vezet, míg a heterozigóta mutáns esetében disztális aganglionózis figyelhető meg (Southard-Smith és mtsai 1998, Kapur 1999). A Phox2b transzkripciós faktor mutációja esetén a Sox10 szupressziója nem következik be, ezáltal az entericus ganglionléc-eredetű sejtek differenciálódása a glia sejtvonal irányába tolódik el. Mutációja a vastagbél disztális szakaszának aganglionózisához valamint hipoganglionózishoz és ektopikus ganglionok megjelenéséhez vezet (Nagashimada és mtsai 2012). A Mash1 transzkripciós faktor delécióna késleltetett neurogenézisben és a nyelöcső területén, az entericus neuronok hiányában nyilvánul meg (Guillemot és mtsai 1993, Memic és mtsai 2016). A HAND2 (Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 2) egyike a neurotranszmitter specifikációhoz szükséges transzkripciós faktoroknak. Mutációja esetén a bélidegrendszer kolonizációja ugyan végbemegy, de a neuronális differenciáció károsodása, az entericus neuronok számának csökkenése és az nNOS-, calretinin-, és VIP expresszáló neuronok elvesztése következtében funkcionális aganglionózis alakul

ki (D'Autreaux és mtsai 2011, Lei és Howard 2011). Továbbá, a ganglionléc-eredetű sejtek felszínükön számos, a mesenchymalis ECM-szal alkotott kapcsolatukat szabályozó sejtadhéziós molekulát expresszálnak, melyek közül az L1CAM gén mutációjának és a béta-1 integrin homozigóta deléciójának is szerepe lehet az aganglionotikus utóbél és így a Hirschsprung-kór kialakulásában is (Breau és mtsai 2009, Wallace és mtsai 2011, Gazquez és mtsai 2016). Az N-cadherin sejtadhéziós molekula hiányában szintén zavart szenved a bélidegrendszer fejlődése (Broders-Bondon és mtsai 2012).

A bélidegrendszert érintő rendellenességek hátterében a mesenchymalis komponenseken kívül néhány kísérleti eredmény a bélhamban termelt morfogének szerepét is felveti. Az Shh célzott mutációjakor a ganglionléc-eredetű sejtek ugyan kolonizálják a belet, de a megnövekedett mennyiségű enterális neuron rendezetlenül, a hám alatti mesenchymában is megjelenő ektopikus ganglionokat alkot (Ramalho-Santos és mtsai 2000). Rágcsálókban az Ihh gén mutációja pedig szegmentális aganglionózishoz vezet (Ramalho-Santos és mtsai 2000). Mindezen kísérleti adatok ellenére a Hedgehog fehérjék részvétele egyelőre kevésbé tisztázott. Genome-wide asszociációs tanulmányokkal Hirschsprung-kórban is azonosították a Ptc1 (Sonic hedgehog jelátvitel receptora) és a Gli gének mutációját, melyek elsősorban a ganglionléc-eredetű sejtek proliferációjának, migrációjának és differenciálódásának szabályozásában jelentősek (Ngan és mtsai 2011, Wang és mtsai 2013, Liu és mtsai 2015).

2. táblázat: A Hirschsprung-kór knockout egérmódelljei (Zimmer és Puri 2015)

| Knockout egér | Gén | Funkció | Fenotípus |
|-----------------------|--------|-----------------------------------|---|
| Ret ^{-/-} | RET | Tirozin-kináz receptor | Teljes intesztinális aganglionózis |
| Gdnf ^{f/-} | GDNF | Glia eredetű neurotrofikus faktor | Teljes intesztinális aganglionózis |
| Gfra1 ^{-/-} | GFRa1 | GDNF receptor alpha 1 | Teljes intesztinális aganglionózis |
| Gfra2 ^{-/-} | GFRa2 | GDNF receptor alpha 2 | Hipoganglionózis |
| Ntn ^{-/-} | NTN | Neurturin, RET ligand | Hipoganglionózis |
| Etr3 ^{-/-} | Edn3 | Endothelin-3 | Utóbél disztális szakaszának aganglionózisa |
| Ednrb ^{-/-} | EDNRB | Endothelin B receptor | Utóbél disztális szakaszának aganglionózisa |
| Sox10Dom, DOM | Sox10 | Sry/HMG box transzkripciós faktor | Teljes intesztinális aganglionózis |
| Phox2b ^{-/-} | Phox2b | Paired-like homebox 2 | Teljes intesztinális aganglionózis |
| Ihh ^{-/-} | IHH | Indian hedgehog | Szegmentális aganglionózis |
| Shh ^{-/-} | SHH | Sonic hedgehog | Ektópikus neuronok a mucosában |

2.6. Az extracelluláris mátrix szerepe a bélidegrendszer normál és patológiás fejlődésében

A mesenchymalis és epithelialis eredetű növekedési faktorokon kívül a bél mesenchymájában termelt mátrix is összefüggésbe hozható a bélidegrendszer veleszületett fejlődési rendellenességeivel. Az ECM minden szövetben jelen lévő komplex dinamikus vázat alkot, mely nem csak passzív közeg, hanem számos élettani folyamat, mint például az embrionális fejlődés, véralvadás, angiogenezis, sebgyógyulás, gyulladás, metasztázis képzés és a különböző szervekben bekövetkező fibrotikus átalakulás aktív résztvevője is. Szerepet játszik a szöveti integritás fenntartásában. Mivel a bél minden rétegében jelen van, így a ganglionléc-eredetű sejteket fogadó

mikrokörnyezetként, megfelelő összetétele elengedhetetlen a bélidegrendszer optimális fejlődéséhez. A bélidegrendszer fejlődésének szabályozása során az entericus ganglionléc-eredetű sejtek migrációjához szükséges fizikai felszín biztosításán túl fontos szignálként is szolgál (Perris és Perissinotto 2000). Emlősökben jelenleg közel 300, a matrisome-nak nevezett ECM alkotásában részt vevő proteint azonosítottak. A matrisome egy gyűjtőfogalom, mely magában foglalja az ECM mindhárom fő komponensét, azaz a kollagéneket (> 43), a proteoglikánokat (~36) és a glikoproteineket (~200) (Hynes és Naba 2012). Az ECM molekulák kétféle módon fordulhatnak elő vagy a kötőszövetben egyenletesen elosztva vagy a hám alatti bazális membrán részeként, különböző szerveket körülvéve.

A kollagének az ECM fő struktúrfehérjéi. A jelenleg ismert 28 kollagén 7 osztályba sorolható: fibrilláris kollagének (kollagén I-III, V, XI, XXIV és XXVII); hálózatképző kollagének (kollagén IV, VIII, X); fibrillum asszociált, megszakított triplahélixet tartalmazó kollagének (kollagén IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII); membrán asszociált, megszakított triplahélixet tartalmazó kollagének (kollagén XIII, XVII, XXIII, XXV); horgonyzó fibrillum (kollagén VII); gyöngyös filamentum képző kollagén (kollagén VI, XXVI, XXVIII); multiplexinek (kollagén XV, XVIII). Az utóbbi csoportba tartozó kollagénekről adott proteáz enzim aktív molekulát (endosztatin) hasíthat le, ezért a kollagén XV-öt és kollagén XVIII-at endosztatin-képző kollagéneknek is nevezik (Theocharis és mtsai 2016). A proteoglikánok, mint például az agrekán, verszikán, perlekán és dekorin különböző glükózaminoglikán (GAG) oldallánccal rendelkező fehérjék. A proteoglikánok vázát tengelyfehérje képezi, melynek polipeptidláncához, egy vagy több GAG-lánc (egyforma, de akár különböző is lehet) négy hexózból álló tetraszacharidon keresztül, kovalens kötéssel kapcsolódik. Az oldalláncuk típusa alapján kondroitin-, dermatán-, keratán- és heparán-szulfát proteoglikánokat különböztetünk meg. A hialuronsav az egyetlen olyan GAG, mely nem kapcsolódik tengelyfehérjéhez, viszont proteoglikánokkal gyakran ko-aggregátumot képez. Elhelyezkedésük alapján az előzőeknek megfelelően mátrix- (agrekán, perlekán, verszikán, dekorin, biglikán és fibromodulin) és membrán-asszociált (szindekán, glikán, CD44 és thrombomodulin) proteoglikánokat különböztetünk meg. Az ECM harmadik komponense a glikoproteinek, melyek közé a laminin, elasztin, fibronektin, tenascin és tromboszpodin is tartozik (Bonnans és mtsai 2014). A mátrix komponensei folyamatos kölcsönhatásban vannak az embrionálisan fejlődő szervek

össejtjeivel. Régóta ismert, hogy a ganglionlécből származó idegi progenitor sejtek vándorlása során a bél mesenchymalis fala serkentő, megengedő (nem serkenti kifejezetten, ellenben mindig ott van, ahol a sejtek haladnak), vagy gátló környezetet teremt. A bélidegrendszer fejlődés kapcsán Soret és munkatársai néhány éve írták le a migráció sebességét korlátozó kollagén VI $\alpha 4$ alegységének szerepét, ami az embrionális bélfal mentén radiális grádiensnek (belül magas, kívül alacsonyabb expressziós szint) megfelelően fejeződik ki. Hirschsprung-kórban szenvedő betegek biopsziáinak analízise alapján megállapították, hogy a migrációs zavar hátterében a megemelkedett kollagén VI expresszió állhat (Soret és mtsai 2015). A glikoproteinekről régebb óta ismert, hogy változatos funkciót töltenek be a bélidegrendszer fejlődése során. Egy részük, mint a laminin és a fibronectin megtalálható a vándorló bélidegrendszeri prekursorok közelében. Az ECM fehérjék integrin receptorai közé tartozó $\beta 1$ -integrin expressziója az entericus ganglionléc-eredetű sejtek felszínén, ugyancsak rámutat a mátrix molekulák sejtmigrációban betöltött szerepére (Breau és mtsai 2006, Nagy és mtsai 2009). Igazoltnak látszik továbbá, hogy maguk az entericus ganglionléc-eredetű sejtek is hatással vannak az ECM összetételére. A vagalis ganglionléc-eredetű sejtek például promigratorikus hatású tenaszcin (TNC) termelésükkel formálják mikrokörnyezetüket (Newgreen és mtsai 1980, Nagy és Goldstein 2006a, Akbareian és mtsai 2013). A ganglionléc-eredetű sejtek mátrixmetalloproteáz termelésükkel pedig aktívan átalakítják a befogadó szövet ECM összetételét (remodelling) (Chevalier és mtsai 2016). Mindezen adatok ellenére az ECM összetételének és expressziós mintázatának változása a bélidegrendszer normál (ganglionléc sejtek bevándorlása előtt, idején, illetve a kolonizációt befejező differenciálódási folyamatokban) és patológiás fejlődése kapcsán nem minden részletében ismert. A Hirschsprung-kórban és a hozzá asszociált fejlődési hibák hátterében megfigyelték, hogy az ECM-ot alkotó kollagének (kollagén IV), proteoglikánok és glikoproteinek (laminin, fibronectin, tenaszcin, nidogen) expressziós mintázata is megváltozott (Fujimoto és mtsai 1989, Parikh és mtsai 1992a, Parikh és mtsai 1992b, Parikh és mtsai 1994, Parikh és mtsai 1995). Bár mindezt alapos vizsgálatnak még nem vetették alá, de ezt látszik igazolni az endothelin 3 ($Edn3^{-/-}$) és az endothelin receptor B ($EdnrB^{-/-}$) mutáns egerek aganglionotikus bélszakaszának megemelkedett laminin, kollagén IV, perlekán, agrekán és verszikán expressziója (Payette és mtsai 1988, Tennyson és mtsai 1990). Zhang és munkatársai humán Hirschsprung-kóros mintákban összehasonlították a normál és az aganglionotikus

bélszakaszok fehérjeprofilját. Tömegspektrometriával és gélelektroforézissel kombinálva 30 olyan fehérjét azonosítottak, melyek legalább 8x-os expressziós különbséget mutattak a különböző szakaszokban. A mátrixproteinek közül a laminin, a fibrinogén és a szepin expressziója változott meg jelentősen (Zhang és mtsai 2014). Az eddigi adatok alapján elmondható, hogy a Hirschsprung-kórban a ganglionotikus és az aganglionotikus bélszakasz között bár megfigyelték a mátrix molekulák expressziójának eltérését, ennek ellenére a fehérjék pontos expressziója, hatásmechanizmusa, illetve fejlődésben betöltött szerepe mindmáig nem ismert.

2.7. A csirke embrió szerepe a bélidegrendszert érintő betegségek patogenezisének tanulmányozásában

A bélidegrendszeri betegségek összejtekkel való kezelésének sikerességéhez elengedhetetlen a patológiás állapotok megértése. A releváns eredményekhez olyan ideális modellek szükségesek, amelyek fenotípusa a humán normál vagy patológiás állapotokban leirtakhoz leginkább hasonlít. Nehézséget jelent, hogy a különböző állatfajokban a bélidegrendszer kialakulásának mechanizmusa eltér egymástól. Kétélűekben és hüllőkben a submucosalis plexus kizárólag a nyelőcső és a gyomor területén található, egérben csak posztnatálisan alakul ki, zebrahalban pedig teljesen hiányzik (Gunn 1951, Lamanna és mtsai 1999, Wallace és mtsai 2005). Madárban és emberben egységesen, már embrionális korban mindkét neurális plexus megjelenik. Időrendben rendszerint a plexus myentericus alakul ki előbb, ez alól egyedül a madár utóbele képez kivételt, ahol fordított sorrendben, a submucosalis plexus jelenik meg korábban (érdekesség, hogy ennek ellenére a neuronális differenciálódás folyamata a myentericus plexus területén hamarabb zajlik) (Burns és Douarin 1998, McKeown és mtsai 2001, Nagy és mtsai 2007, Nagy és mtsai 2012). Fejlődésbeli különbségek miatt a megfelelő modellállat kiválasztása minden embriót célzó kutatás egyik meghatározó mozzanata. Az embriológiai kísérletek tervezésénél legtöbbször az esetmuslica (*Drosophila melanogaster*), fonalféreg (*Nematoda*), afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*), zebrahal (*Danio rerio*), csirke (*Gallus gallus domesticus*) vagy egér (*Mus musculus*) modell valamelyikére esik a választás. Mindegyiknek megvan a maga előnye ezért mindig az adott kérdés szempontjából kell kiválasztani a megfelelő rendszert.

Az elmúlt évtizedek során a madár embrió újra az érdeklődés középpontjába került. A leggyakrabban használt faj a házi tyúk (*Gallus gallus*) és a Japán fűrj

(*Cortornix japonicum*). A csirke embriót könnyű hozzáférhetősége, fenntarthatósága, gyors fejlődése, manipulálhatósága és ellenállóképessége miatt régóta alkalmazzák erre a célra. A csirke genom sikeres szekvenálása pedig tovább növelte a modellrendszer erősségét, megteremtette a genetikai manipulációk lehetőségét, mely hozzájárulhat az embriogenezis alapkérdéseinek megválaszolásához (Hillier és mtsai 2014). Amióta a bélidegrendszer ganglionléc eredetét csirke embrión sikerült bizonyítani, azóta széles körben alkalmazzák a különböző őssejtek migrációs útvonalának és sorstérképezésének tanulmányozására. A madárembriókon végzett embriómanipulációs és sejtjelölési kísérletekkel egy adott sejtípus eredete, vándorlása és differenciálódása is nyomon követhető. A csirke-fürj kiméra további lehetőségeket kínál a madár, mint fejlődéstani modell alkalmazására. 1973-ban LeDouarin és Teillet a kiméra technikának köszönhetően bizonyították a bélidegrendszer sejtjeinek velőcső eredetét, ahonnan a sejtek a bélcsőbe vándorolnak és később glia és neuron sejtekké differenciálódnak (Le Douarin és Teillet 1973). Az egyes sejtípusok eredetének és sorsának meghatározásához a szervtelepek intraembrionális transzplantációja további lehetőséget biztosít. Vizsgálható a ganglionléc-eredetű őssejtek sorsa vagy például a végtagok myotom és a bordák szklerotom eredete. Ezzel a technikával a hemopoiotikus és a dendritikus sejtek eredetének kísérletes bizonyítására is lehetőség nyílt (Catala és mtsai 1995, Brand-Saberi és Christ 2000, Le Douarin és mtsai 2000, Nagy és mtsai 2005). A hibridóma technikának köszönhetően, a differenciálódó sejtípusok tanulmányozására specifikus monoklonális ellenanyagok állnak rendelkezésünkre (Nagy és mtsai 2001, Oláh és mtsai 2002, Gumati és mtsai 2003, Bódi és mtsai 2009). Ezek az újítások hozzájárultak ahhoz, hogy a csirke embrió ismét egy vonzó kísérleti modellrendszeré válhasson. Annak ellenére, hogy madár modellben is egyre többen kombinálják a klasszikus metodikákat a genetikai technikákkal, mégis bizonyos fejlődés-genetikai vizsgálatoknál a többi modellállattal szemben továbbra is jelentős hátrányban van. Az emlős és kétéltű embriók nagy előnye a célzott genetikai és null-mutáns állatok előállításának lehetősége, azonban az egerekben kivitelezhető transzgenikus technikák egyrészt nagyon költség- és időigényes módszerek, másrészt a null-mutáns egerek többségének korai, embrionális lethálitása korlátozza a kísérletek megvalósíthatóságát. A két faj előnyeit ötvöző csirke-egér kiméra embriók alkalmazása valós alternatívaként szolgálhat (Nagy és Goldstein 2006b). Az elmúlt két évtizedben exogén gének csirke embrióba vitelére is számos hatékony módszert fejlesztettek ki (Ishii és Mikawa 2005). A madárban rendelkezésre álló szomatikus transzgenikus technikát jelenleg az

elektroporáció és a retrovírus által közvetített géntranszfer képviseli. Míg az elektroporáció a bevitt gének gyors és hatékony kifejezését (funkciónyerést) teszi lehetővé, addig a retrovirális vektor, az exogén gén gazdakromoszómába integrálásával, a funkcióvesztés hosszú távú hatásának elemzését biztosítja (Ishii és mtsai 2004, Kos és mtsai 2003, Uchikawa és mtsai 2004). Az elsőként megismert és azóta is széles körben alkalmazott retrovírus, a madarakat fertőző Rous-sarcoma vírusból módosított replikáció-kompetens Rous-asszociált vírus (RCAS). Az RCAS retrovírusba tetszőleges gén klónozható, így ez a módszer jól alkalmazható például transzkripciós és növekedési faktorok fejlődésbiológiai funkciójának vizsgálatára (Iba 2000, Goldstein és mtsai 2005, Stern 2005). Bár ezek a technikák a génexpresszió tér-időbeli szabályozására ugyan lehetőséget biztosítanak (Darnell és Schoenwolf 2000, Streit és mtsai 2013), de az így elért célzott funkció-vesztő és funkció-nyerő mutációk csak átmeneti jellegűek, melynek oka a proliferáció hatására bekövetkező “felhígulása” lehet. A specificitás hiánya és a toxicitás veszélye további problémát jelent (Eisen és Smith 2008, Gerety és Wilkinson 2011, Schulte-Merker és mtsai 2014, Kok és mtsai 2015). A hátrányok kiküszöbölésére ígéretes alternatívát a CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Pallindromic Repeats/CRISPR-Associated Protein 9) technika jelenthet, mellyel a célgénnek hatékonyabb gátlása érhető el (Gandhi és mtsai 2017).

3. CÉLKITŰZÉSEK

A Semmelweis Egyetem Őssejt és Kísérletes Embriológia Laboratóriuma együttműködve a bostoni Harvard Egyetem Gyermekebészeti Tanszékével azt tűzte ki célul, hogy karakterizálja a normál és a Hirschsprung-kórra jellemző rendellenes bélidegrendszer embrionális fejlődését. A bélidegrendszert létrehozó ganglionléc-eredetű őssejtek tanulmányozása a neurointesztinális kórképek patológiai hátterének megismerésén túl az őssejtterápiás kezelések jövőbeni alkalmazhatósága szempontjából is nagy jelentőséggel bír. Az őssejtek fejlődését meghatározó extracelluláris mikrokörnyezet nem csak a sejtttranszplantációt megelőző *in vitro* felszaporítás fázisában fontos, hanem a beültetést követően, a megfelelő szöveti környezet megteremtésében is szerepet játszik.

Kísérletes munkánk célkitűzései a következők voltak:

1. A ganglionléc-eredetű őssejtek vándorlásának és differenciálódásának karakterizálása a bélidegrendszer ontogenezise során.
2. A hám eredetű Shh növekedési faktor tanulmányozása a bélidegrendszer fejlődésben.
3. A ganglionléc-eredetű őssejtek mikrokörnyezetét meghatározó ECM expressziós mintázatának jellemzése a bélidegrendszer normál és patológiás fejlődése során.

4. MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti állatok

Kísérleteink során csirke (*Gallus gallus domesticus*, White Leghorn SPF, Phylaxia Sanophi, Magyarország) és egér embriókat használtunk fel, melyek korát embrionális napokban fejeztük ki (E). A csirketojásokat laboratóriumunk keltetőgépeiben forgatórácon inkubáltuk, 38 °C-on, 90%-os páratartalom mellett. Az endothelin receptor B (*EdnrB^{-/-}*) (*Ednrb^{tm1Ywa/J}*; JAX#003295), *Tau^{GFP/+}* [*Tau (Mapt) KO* (az összes neuron fluoreszcensen jelzett), #004779], *Col18^{-/-}* (kollagén XVIII null mutáns), *Plp1^{GFP}* (PLP-EGFP) (az összes glia fluoreszcensen jelzett), *Wnt1-Cre;tdTomato* (*Wnt1;tdT*) (az összes ganglionléc-eredetű sejt fluoreszcensen jelzett) transzgenikus egereket Prof. Allan Goldstein (Harvard Medical School) laboratóriumának közreműködésével szereztük be. Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével történtek (engedélyszám: 779-000-2005).

4.2. A minták szövettani feldolgoása

A vékony- és vastagbélszakaszok embrióból történő eltávolítását sztereomikroszkóp alatt végeztük, melyhez különböző, mikropreparációs technikára alkalmas eszközöket (mikroolló, csipesz, rovartű, embrióspatula) 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 pufferelt 4%-os paraformaldehidben (PFA) fixáltuk, ezután foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS, pH 7,2) háromszor 5 percig mostuk. A fixálást követően egy éjszakán keresztül 15%-os szacharóz (Molar Chemicals Kft., 02200-203-190) PBS oldatában 4°C-on inkubáltuk. A beágyazást megelőzően 37°C-on, 1 órán keresztül, 15% szacharózt és 7,5% zselatint (Fluka, 04055) tartalmazó PBS elegyében inkubáltuk. Ezt követően a szerveket műanyag mérőtálcákba kiöntött zselatinra helyeztük, orientáltuk, majd pár percig várakoztattuk, hogy a „zselatinágyhoz” tapadjanak. A még meleg és folyékony zselatinnal egy újabb réteget képezve befedtük a preparátumokat és 4°C-on, 10 percig állni hagytuk, hogy a zselatin megszilárduljon. Az 1x1cm-es méretre vágott zselatinos blokkokat Shandon

Cryomatrix-szal (Anatomical Pathology IND, 67690006) 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.

4.3. Immuncitokémia

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

4.3.1. Immunhisztokémia

A fagyasztott metszetekből a zselatin kioldását 37°C -ra felmelegített PBS-ben végeztük (3-5 perc), majd a PBS-t szobahőmérsékletűre cserélve további 5-7 percig rehidráltuk. Ezt követően a metszetekre ráértük a primer ellenanyagokat (3. táblázat) (50-80 μl /metszet). A festések során alkalmazott primer ellenanyagok a laborunkban felszaporított hibridómák 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 a metszetekre szekunder ellenanyagot (4. táblázat) mértünk 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_2O_2 -ba (Sigma-Aldrich, H1009) helyeztük, amit ismét PBS-ben történő mosás (3x5 perc) követett. A mosás után az ABC komplexet (avidin-biotin-peroxidáz komplex, Vectaststain Elite PK-6100; Vector Laboratories) vittük 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 hozzáadtuk a biotinilált peroxidázt tartalmazó oldat megfelelő mennyiségét, 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 (100 μl 4-

chloro-1-naftol törzsoldat 100 ml PBS-ben oldva), majd 300 µl 3%-os H₂O₂-ot adtunk hozzá, amelyet előzőleg sötétben mágneses keverőn legalább fél órát kevertettünk. Felhasználása előtt szűrőpapíron átszűrtük majd a metszeteket sötét helyen, 30 percig inkubáltuk. A színreakció előhívása után 3x5 perces PBS mosás következett, majd a metszeteket vízdékony fedőanyaggal (Poly-Aqua Polyscience Inc., Warrington PA, USA,18606) fedtük le.

4.3.2. *Teljes szervi („whole mount”) immunfestés*

Néhány esetben a mikroszkópos vizsgálatokat nem metszeteken, hanem teljes béldarabokon végeztük. Ennek során a következőképpen jártunk el: A kiproparált béltraktust 3x5 percig PBS-ben mostuk, majd ezt követően a primer ellenanyagból körülbelül 300 µl-t mértünk rá oly módon, hogy az a béldarabot teljesen ellepje. 1 órás rázógépen történő inkubálást követően 4x10 percig ismételt 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.

4.3.3. *Immunfluoreszcencia*

A metszetek előkészítését, valamint primer ellenanyaggal történő inkubálását az immunhisztokémiai fejezetben leírtakkal azonos módon végeztük. Következő lépésben szekunder ellenanyagot (50-80 µl/metszet) mértünk a metszetekre, ami lehetett közvetlenül fluorokrómmal jelölt (5. táblázat) vagy biotinnal konjugált ellenanyag. Az inkubálást szobahőmérsékleten, fénytől védett, nedves kamrában, 45 percen keresztül végeztük. A biotinilált szekunder ellenanyagok bekötődésének detektálására PBS-ben hígított (1:100) streptavidinnel konjugált fluorókrómot (Streptavidin Alexa-Fluor 594, Invitrogen, S11227 és Streptavidin Alexa-Fluor 488, S32354) alkalmaztunk, mely 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 1µg/ml arányban hígítottunk. A Dapi oldatot a PBS-ben történő mosást megelőzően mértük a metszetekre és 15 percig hagytuk a lemezeken, ezután lefedtük őket és a továbbiakban, sötétben, 4C°-on tároltuk.

A kettős immunfestés első lépéseként a metszetekre ráértük az első primer ellenanyagot, melyet az előzőekben részletezett módon 45 percig inkubáltunk. A PBS-ben történő mosást követően a metszetekre közvetlenül fluorókrómmal jelölt szekunder ellenanyagot (5. táblázat) vittünk fel, mely a primer ellenanyagnak megfelelően izotípus specifikus volt. Az immunfestést a fluorokróom 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 inkubáltunk majd 3x5 percig PBS-ben mostunk. A második szekunder ellenanyagot, amellyel úgyszintén 45 percig inkubáltunk (mely a második primer ellenanyagra faj és izotípus specifikus volt) úgy választottuk meg, hogy a vele konjugált fluorokróom színe eltérjen az első körben használt szekunder ellenanyag színétől. A sejtmagok kimutatását ebben az esetben is DAPI-val végeztük. A mosás után (PBS) a tárgylemezeket vízdékony fedőanyaggal lefedtük és hűtőben 4C°-on tároltuk.

4.4. *In situ* hibridizáció

A Shh jelátvitel molekuláinak (Shh, Ptc1, Ptc2) génexpresszióját paraffinos metszeteken [Cliff Tabin szívességéből (Riddle és mtsai 1993, Roberts és mtsai 1995)] *in situ* hibridizációval vizsgáltuk (Riddle és mtsai 1993, Acloque és mtsai 2008). A transzformált E.coli (Invitrogen; C404003) sejtekben kifejeztetett plazmidokból, linearizálást követően *in vitro* transzkripcióval RNS ribopróbákat készítettünk és digoxigeninnel jelöltük. *In situ* hibridizációhoz kromogén szubsztrátnak BM-Purple (Roche, 11442074001) oldatát használtuk.

4.5. Az immunfestés során felhasznált primer és szekunder ellenanyagok táblázatos összefoglalása

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

| Ellenanyag (klón) | Izotípus | Felismert sejtípus, struktúra, molekula | Hígítás | Beszerzési forrás, katalógusszám |
|---------------------|-------------------|---|---------|--|
| p75 | Poliklonális nyúl | Csirke ENCC | 1:700 | Dr. Louis Reichardt szívességéből, (Weskamp és Reichardt 1991) |
| p75 | Poliklonális nyúl | Egér ENCC | 1:300 | Promega (G3231) |
| CD57 (HNK-1) | Egér IgM | Csirke ENCC | 1:50 | NeoMarkers (MS-1163-R7) |
| Sox10 | Egér IgG1 | Csirke ENCC | 1:10 | Dr. Michael Wegner szívességéből (Rehberg és mtsai 2002) |
| N-cadherin | Egér IgG1 | Csirke ENCC | 1:20 | DSHB |
| Tuj1 (B1195) | Egér IgG2a | Neuron marker | 1:200 | Covance (MMS-435P) |
| HuC/HuD (16A11) | Egér IgG2a | Neuron marker | 1:100 | Invitrogen (A-21271) |
| Neurofilament (4H6) | Egér IgG1 | Neuron marker | 1:10 | DSHB |
| Bfabp | Poliklonális nyúl | Glia marker | 1:200 | Dr. Thomas Müller szívességéből (Kurtz és mtsai 1994) |
| GFAP | Poliklonális nyúl | Glia marker | 1:300 | DAKO (Z0334) |
| Fibronectin (B3/D6) | Egér IgG2a | Csirke extracelluláris mátrix | 1:5 | DSHB |
| Laminin (31, 31-2) | Egér IgG1 | Csirke extracelluláris mátrix | 1:40 | DSHB |

| | | | | |
|--|----------------------|---|--------|---|
| Tenascin-C (M1B4) | Egér IgG1 | Csirke extracelluláris mátrix | 1:10 | DSHB |
| Fibrillin 2-like (JB3) | Egér IgG1 | Csirke extracelluláris mátrix | 1:10 | DSHB |
| Kollagén I (DD4/F12) | Egér IgG2a | Csirke extracelluláris mátrix | 1:2 | Dr. Thomas F. Linsenmayer szívességéből, (Birk és mtsai 1988) |
| Kollagén I (I- 8H5) | Egér IgG2a | Csirke extracelluláris mátrix | 1:1000 | MP Biomedicals (631701) |
| Kollagén III (3B2) | Egér IgG1 | Csirke extracelluláris mátrix | 1:10 | DSHB |
| Kollagén IV (IF8) | Egér IgG2a | Csirke extracelluláris mátrix | 1:2 | Dr. Thomas F. Linsenmayer szívességéből (Fitch és mtsai 1990) |
| Kollagén VI (39) | Egér IgG1 | Csirke extracelluláris mátrix | 1:5 | DSHB |
| Kondroitin- szulfát proteoglikán (CS-56) | Egér IgM | A natív CSPG glükózaminoglikán részét | 1:2000 | Sigma (C8350) |
| Kollagén IX (2B9) | Egér IgM | Csirke extracelluláris mátrix | 1:2 | DSHB |
| Kollagén XVIII (6C4) | Egér IgG1 | Csirke extracelluláris mátrix | 1:2 | DSHB |
| Heparán- szulfát proteoglikán (33, 33-2) | Egér IgG | Csirke extracelluláris mátrix | 1:5 | DSHB |
| Versican (GAG β domain in the core protein of the V0 and V1 isoforms) | Poliklonális nyúl | Extracelluláris mátrix | 1:500 | Dr. Maria T. Dours- Zimmermann szívességéből, (Landolt és mtsai 1995) |

| | | | | |
|--|---------------------|-------------------------------|--------|---|
| Versican (GAG α domain in the core protein of the V0 and V2 isoforms) | Poliklonális nyúl | Extracelluláris mátrix | 1:200 | Dr. Maria T. Dours-Zimmermann szívességéből, (Dutt és mtsai 2011) |
| Versican (core protein in the V0 and V2 isoforms of versican) | Poliklonális nyúl | Extracelluláris mátrix | 1:500 | Dr. Steve Hoffman szívességéből, (Zanin és mtsai 1999) |
| Agrin (6D2) | Egér IgG1 | Csirke extracelluláris mátrix | 1:5 | DSHB |
| Perlekán (5C9) | Egér IgG1 | Csirke extracelluláris mátrix | 1:5 | DSHB |
| Kollagén XVIII (NC11) | Poliklonális nyúl | Egér extracelluláris mátrix | 1:1000 | Dr. Takako Sasaki szívességéből, (Sasaki és mtsai 1998) |
| Kollagén XVIII (NC1) | Poliklonális nyúl | Egér extracelluláris mátrix | 1:300 | Dr. Takako Sasaki szívességéből, (Sasaki és mtsai 1998) |
| Endosztatin (1092) | Poliklonális nyúl | Egér extracelluláris mátrix | 1:100 | Dr. Takako Sasaki szívességéből, (Sasaki és mtsai 1998) |
| Agrin | Poliklonális kecske | Egér extracelluláris mátrix | 1:100 | R&D System (AF550) |
| MEP21 (α -chicken podocalyxin) | Egér IgG1 | Csirke endothel sejt | 1:200 | Kelly McNagny szívességéből, (McNagny és mtsai 1997) |
| Beta-dystroglycan (43DAG1/8) | Egér IgG2a | Agrin receptor | 1:50 | Leica Biosystems (NCL-b-DG) |
| Endosztatin | Poliklonális kecske | Humán extracelluláris mátrix | 1:40 | R&D System (AF1098) |

| | | | | |
|---------------------------------|---------------------|---|-------|---|
| Laminin | Poliklonális nyúl | Egér extracelluláris mátrix | 1:200 | Abcam (ab11575) |
| PHOX2B | Tengerimalac IgG | ENCC és neuron prekursor | 1:500 | Dr. Hideki Enomoto szívességéből, (Nagashimada és mtsai 2012) |
| SOX10 (20B7) | Egér IgG1 | ENCC és glia prekursor | 1:50 | Thermo Fisher (14-5923-80) |
| Agrin | Egér IgG1 | Egér extracelluláris mátrix | 1:10 | Millipore (Mab5204) |
| CN | Egér IgG | Csirke specifikus neuron marker | 1:10 | Dr. Hideaki Tanaka szívességéből (Tanaka és mtsai 1990) |
| Ret | Kecske IgG | Egér specifikus ENCC | 1:25 | Neuromics (GT15002) |
| BrdU (G3G4) | Egér IgG1 | Osztódó sejtek | 1:2 | DSHB |
| Alpha-smooth muscle actin (1A4) | Egér IgG2a | Simaizom marker | 1:400 | DAKO (M0851) |
| AMV-3C2 | Egér IgG1 | RCAS retrovírus tokfehérje | 1:5 | DSHB |
| QCPN | Egér IgG1 | Fürj specifikus perinukleáris antigén | 1:2 | DSHB |
| 8F3 | Egér IgG1 | Csirke specifikus citoplazma antigén | 1:2 | DSHB |
| Shh (5E1) | Egér IgG1 | Sonic hedgehog fehérjét szekretáló sejtek | 1:2 | DSHB |
| Shh | Poliklonális nyúl | Sonic hedgehog fehérje N-terminusa | 1:400 | Santa Cruz (sc-9024) |
| Ptc1 | Poliklonális kecske | Patched fehérje N-terminusa | 1:20 | Santa Cruz (sc-6149) |
| E-cadherin (36) | Egér IgG2a | Epithel sejt | 1:200 | BD Bioscience (610181) |
| cleaved caspase-3 | Poliklonális nyúl | Apoptotikus sejt | 1:50 | Cell Signaling (9064) |

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

| Szekunder ellenanyag | Beszerzési forrás | Katalógusszám |
|---|--------------------------------|---------------|
| lóban készült biotinilált anti-egér IgG (H+L) | Vector Laboratories | BA-2000 |
| kecskében készült biotinilált anti-nyúl IgG (H+L) | Vector Laboratories | BA-1000 |
| kecskében készült biotinilált anti-egér IgM (μ lánc) | Vector Laboratories | BA-2020 |
| kecskében készült peroxidáz kapcsolt anti-egér IgG | Santa Cruz Biotechnology, Inc. | SC-2005 |
| szamárban készült biotinilált anti-tengerimalac IgG (H+L) | Millipore | AP-193B |

5. táblázat: Fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyagok (Invitrogen-Life Technologies, Merck): A táblázat tartalmazza az ellenanyagok faj és izotípus specifitást, a fluoreszcencia csúcsintenzitást, beszerzési forrását és a katalógus számot. Hígítás: 1:100 PBS-ben

| Szekunder ellenanyag | Fluorokróm excitációs hullámhossza | Beszerzési forrás | Katalógusszám |
|--|------------------------------------|------------------------------|---------------|
| kecskében készült anti-egér IgG (H+L) | 350 | Invitrogen-Life Technologies | A-21049 |
| kecskében készült anti-egér IgG (H+L) | 488 | Invitrogen-Life Technologies | A-11001 |
| kecskében készült anti-egér IgG (H+L) | 594 | Invitrogen-Life Technologies | A-11005 |
| kecskében készült anti-egér IgG1 (γ 1) | 488 | Invitrogen-Life Technologies | A-21121 |
| kecskében készült anti-egér IgG1 (γ 1) | 594 | Invitrogen-Life Technologies | A-21125 |
| kecskében készült anti-egér IgG2a (γ 2a) | 488 | Invitrogen-Life Technologies | A-21131 |

| | | | |
|--|-----|------------------------------|----------|
| kecskében készült anti-egér IgG2b (γ 2b) | 488 | Invitrogen-Life Technologies | A-21141 |
| kecskében készült anti-egér IgG2b (γ 2b) | 594 | Invitrogen-Life Technologies | A-21145 |
| kecskében készült anti-egér IgM (μ lánc) | 488 | Invitrogen-Life Technologies | A-21042 |
| kecskében készült anti-egér IgM (μ lánc) | 594 | Invitrogen-Life Technologies | A-21044 |
| kecskében készült antinyúl IgG (H+L) | 488 | Invitrogen-Life Technologies | A-11008 |
| kecskében készült antinyúl IgG (H+L) | 594 | Invitrogen-Life Technologies | A-11012 |
| szamárban készült anti-egér IgG (H+L) | 546 | Invitrogen-Life Technologies | A-10036 |
| szamárban készült anti-egér IgG (H+L) | 647 | Invitrogen-Life Technologies | A-31571 |
| szamárban készült antikecske IgG (H+L) | 488 | Invitrogen-Life Technologies | A-11055 |
| szamárban készült antinyúl IgG (H+L) | 488 | Invitrogen-Life Technologies | A-21206 |
| szamárban készült antinyúl IgG (H+L) | 546 | Invitrogen-Life Technologies | A-10040 |
| szamárban készült antitengerimalac IgG (H+L) | 647 | Millipore | AP193SA6 |

4.6. Sejtosztódás kimutatása bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine: BrdU) és EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) jelöléssel

A proliferáló sejtek detektálására sok esetben bromodeoxyuridin (BrdU)-t használnak, mely az osztódó sejtek újonnan szintetizálódó DNS-ébe épül be. A beépülő BrdU specifikus ellenanyagokkal kimutatható. Az embrionális szerveket fixálás előtt 37°C-on 3 óráig BrdU oldatban inkubáltuk. 3x5 perces PBS mosás után PFA-ban fixáltuk és zselatinos blokkokba fagyasztottuk. A fagyasztott metszetekre a PBS-es rehidráció és zselatinos kioldás után 1N/2N HCl-ot mértünk és 30 percen át 37°C-on inkubáltuk. Következő lépésben a metszeteket 2x5 percig borát pufferben, majd 2x5

percig PBS-ben mostuk, ezzel semlegesítve a sósav hatást. A fluoreszcensen 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.

A BrdU kezelés kapcsán megjelenő statisztikai adatok a p75 és BrdU markerek koexpressziós százalékaról 5 embrió 4 különböző (egymást nem fedő) metszeti síkjáról, szoftveres számolási adat alapján kerültek megállapításra. A különböző markerekre pozitivitást mutató sejtek megszámlálása, így átlagosan 20 metszet alapján készült el. A csoportok közötti statisztikai szignifikancia értékeléséhez páros t-tesztet használtunk. Amennyiben több mint két csoportot hasonlítottunk össze, a statisztikai szignifikanciát ANOVA teszttel állapítottuk meg. Az eltéréseket $P < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. A számadatok a számtani átlagot és a szórást mutatják százalékban feltüntetve.

Néhány esetben a sejtproliferáció mértékének meghatározásához 5-ethynyl-2'-deoxyuridine-t (EdU) használtunk. A médiumhoz 3 órával a fixálást megelőzően 10 μM EdU-t adtunk. Az EdU beépülését Click-iT EdU Imaging Kit (Invitrogen) segítségével mutattuk ki. A sejtmagok jelölésére DAPI (4,6 diamino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, D1306) reagenst használtunk.

4.7. Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás

A metszeteket Zeiss AxioPhot mikroszkóppal értékeltük és a hozzácsatlakoztatott kamerával (Zeiss AxioCam HCR) különböző nagyításokon digitális képeket készítettünk. A konfokális fotókat Zeiss LSM 710 típusú mikroszkóppal készítettük. A képek későbbi tanulmányozását, szerkesztését ImageJ és Adobe Photoshop CS 7.01 típusú szoftverekkel végeztük.

4.8. Embriómanipuláció

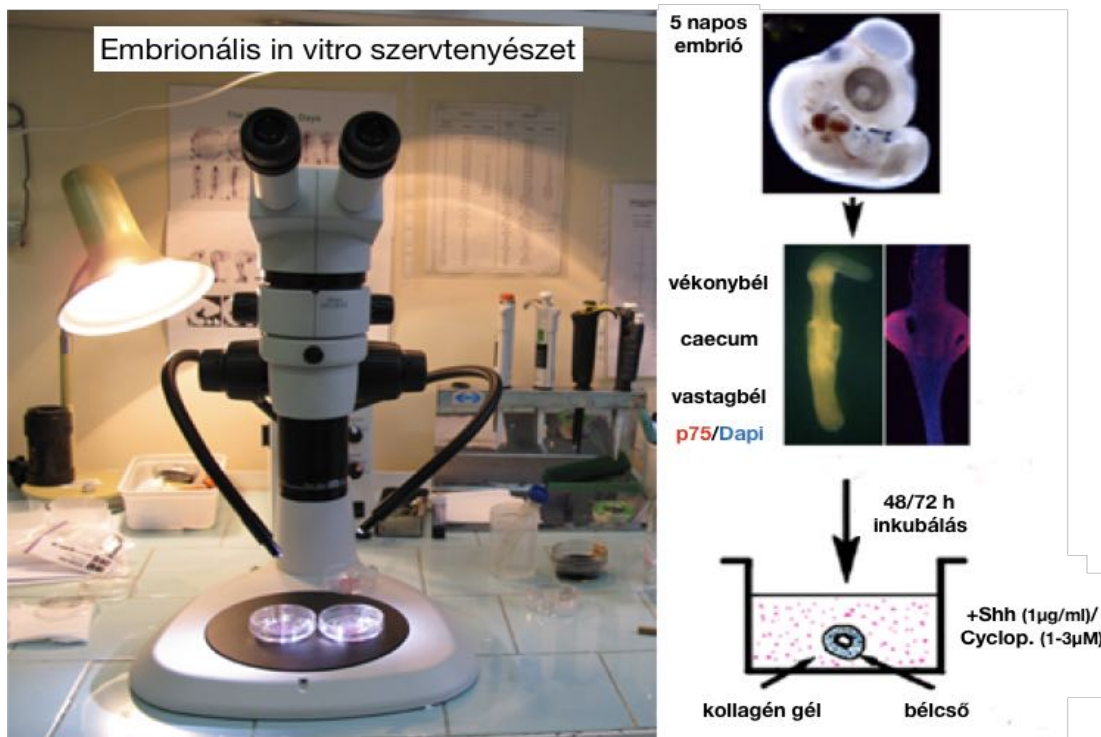
4.8.1. Embriótenyésztés

Kísérleteink során a 5 napos embriókból izolált középbelet és utóbelet tartalmazó bélszakaszt I-es típusú kollagén alapú mátrixba (BD Biosciences, 354236) ágyazva 48-72 óráig tenyésztettük. A tenyésztést erre alkalmas tenyésztőedényekben

végeztük (Falcon Center-Well Organ Culture Dish, 353037). A tenyésztő tálca közepébe kollagén mátrixot, míg a műanyag fallal leválasztott külső részbe penicillin-streptomycines PBS oldatot töltöttünk. Az embriókat a belső kör kollagén mátrixának két rétege közé ágyasztuk és 48-72 órára 37°C-os, sejttenyésztő CO₂ inkubátorba helyeztük.

4.8.2. A kollagén mátrix elkészítése

Első lépésben egy jégkásába helyezett eppendorfba mértük be a 700 µl DMEM-et (tenyésztő tápoldat, Sigma), 6 µl 1N NaOH-ot és 294 µl kollagént (rat tail 3,38%). A kollagén oldatból 350 µl-t belemértünk a tenyésztőedény középső részébe. 5 perc szobahőmérsékleten történő tárolást követően, 5–10 percre CO₂ inkubátorba (a polimerizálódáshoz) helyeztük. Ezt követően az inkubátorból kivettük az edényeket és a gél felszínére helyeztük a preparátumokat. Újabb 10 perces CO₂ inkubálást követően a frissen elkészített gélből 350 µl-el betakartuk a béldarabokat, ügyelve arra, hogy ne ússzanak fel és 48-72 óráig tenyésztettük. A kollagénbe oldva a Shh (R&D Systems, Recombinant mouse Shh, 461-SH-025) (1 µg/ml) növekedési faktornak és inhibitorának a cyclopamine-nak (Toronto Research Chemicals Inc.) (1-3 µM), valamint a mesenchymalis eredetű GDNF-nek (R&D Systems, Recombinant Human GDNF, 212-GD-010) (10-20 µM) a hatását vizsgáltuk (5. ábra).



5. ábra: Az embrionális *in vitro* szervtenyésztet elkészítésének lépései.

4.8.3. Chorioallantois membrántenyésztés (CAM)

A chorioallantois membrántenyésztés alkalmas arra, hogy az izolált embrionális szerveket vagy *in vitro* rekombinált szöveteket hosszabb ideig *in vivo* körülményekhez hasonló miliőben tenyesszük. A kísérletek során mindig 9 napos csirke embriók chorioallantois membránjára transzplantáltuk a szöveteket.

A módszer röviden a következő lépésekből áll: A tojás héját a légkamra fölött csipesszel eltávolítottuk, a héjhártyára pipettával egy-két csepp penicillin-streptomycines PBS oldatot cseppentettünk, majd óvatosan csipesszel megkarcoltuk, ennek hatására az oldat a héjhártya alatt szétterült és így könnyedén leválaszthatóvá vált. Ekkor tárult fel a chorioallantois membrán gazdagon vaszkularizált rétege. Egy nagyobb, Y alakú érágazás kiválasztása után, papírtörő segítségével felszakítottuk a kapillárisokat és erre a területre helyeztük a graftokat. A felesleges folyadékot felitattuk, majd átlátszó ragasztószalaggal lefedtük a tojáshéjon keletkezett nyílást. Megfelelő jelöléssel ellátva a madártojásokat további (az adott kísérlettől függően) 7-9 napig laboratóriumunk keltetőgépében, 38°C-on, 70%-os páratartalom mellett forgatórácon inkubáltuk.

4.8.4. *Shh*-RCAS retrovírus és cyclopamine mikroinjektálása

A retrovírusok segítségével madár embriókban is előidézhető célzott funkció-nyerő és funkció-vesztő mutáció (Iba 2000, Sato és mtsai 2002). Erre az olyan virális vektorok alkalmasak, amelyeket madarakat megfertőző Rous-sarcoma vírusból módosított, replikáció-kompetens vírusokból (RCAS) készítenek. Az RCAS-okban az RNS a genetikai anyag, amelyet a reverz transzkriptáz enzim fordít vissza DNS-re. Az RCAS vírusokba tetszőleges gének klónozhatóak önállóan vagy akár egy markergénnel együtt. A vírus embrióba történő injektálása után az osztódó sejteket fertőzi meg, ahol a retrovírus beépül az újonnan keletkezett sejtek genomjába. Kísérleteinkhez a laborban előzetesen előállított, *Shh*-t tartalmazó *Shh*-RCAS vírust használtuk. A kísérlet során Narishige márkájú mikroinjektorhoz rögzített 100 µl-es Hamilton fecskendő segítségével, vékony üvegapillárison keresztül 5 napos embriók vastagbelébe 2-5 µl *Shh*-RCAS retrovírus szuszpenziót vagy Cyclopamine-t (3 µM) injektáltunk. A beavatkozást megelőzően PBS 0,1%-os Fast Green oldatát adtuk az injektálásra előkészített oldatokhoz. Ezt követően a bélszakaszokat 9 napos embriók chorioallantois membránjára transzplantálva további 9 napon keresztül tenyésztettük.

4.8.5. Egér-csirke testüregkiméra

Az embrionális testüregkimérák alkalmasak embrionális szervek hosszú távú *in vivo* tenyésztésére. A transzplantált szövetek 1-2 nap alatt vaszkularizálódnak és elindul a differenciálódásuk. A testüreg kimérákat Nagy és Goldstein által korábban leírtaknak megfelelően állítottuk össze (Nagy és Goldstein 2006b). A 11.5 napos egér embriókból kipreparált utóbélről eltávolítottuk a caecumot, majd a preganglionotikus (aneurális) utóbélszakaszt steril szénszemcsével történő megjelölést követően 3 napos (HH18 stádiumú) csirke embrió testüregébe transzplantáltuk. Az átültetést megelőzően előkészítettük a fogadó csirke embriót, melynek első lépéseként egy ablakot készítettünk a tojáshéjon, majd a héjhártya és az amnion megnyitásával szabaddá tettük az embriót. Steril tűvel végzett hosszanti bevágást követően az egér embrióból kipreparált bélszakaszt tompa végű üveg pipetta segítségével a fogadó embrióba helyeztük. A transzplantáció befejeztével a tojás héját átlátszó ragasztószalaggal zártuk és további 9 napig inkubáltuk. (A kimérák túlélési rátája (n=9) 65-70% között volt.)

4.8.6. Az entericus idegi őssejtek izolációja, felszaporítása és *in vitro* differenciáltatása

A felnőtt idegi őssejtek *in vitro* tenyésztéséhez 3 hetes Wnt1;tdT egérbélből származó, a disszociálást követő tdT expresszió alapuló "sorterelésen" átesett sejtekből generált, valamint Plp1^{GFP} és Tau^{GFP/+} bélből spontán generált idegi sejtaggregátumokat (neurosphere) alkalmaztunk. Ezeket az idegi sejtaggregátumokat Dr. Ryo Hotta (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School Boston) bocsátotta rendelkezésünkre.

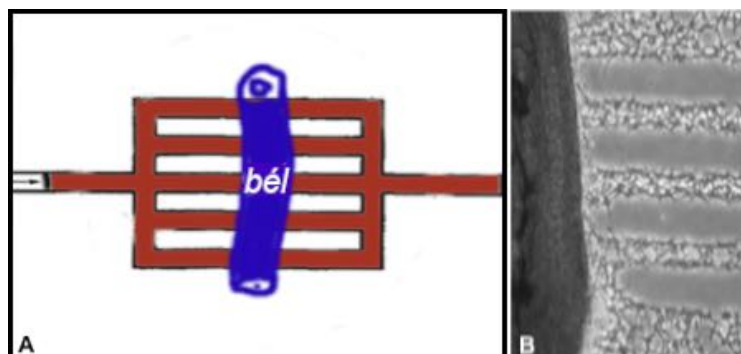
4.8.7. Idegi sejtaggregátumok beültetése aneurális csirke utóbélbe

Az entericus ganglionléc-eredetű sejtek kolonizációját megelőző stádiumban (5 napos csirke embrió) az utóbelet kipreparáltuk, majd a bél proximális szakaszába sztereo mikroszkóp alatt 1-2 idegi sejtaggregátumot implantáltunk. A rekombinációt követően a bélszakaszokat 9 napos fogadó embrió chorioallantois membránjára transzplantálva további 7 napig tenyésztettük, majd szövettanilag feldolgoztuk (n=25).

4.8.8. *In vitro* migráció tanulmányozása „stripe-choice assay” módszerrel

Az entericus ganglionléc-eredetű sejtek *in vitro* vándorlásának tanulmányozására Vielmetter és Yamagishi kutatócsoportja által korábban már leírt módszert alkalmaztuk (Vielmetter és mtsai 1990, Yamagishi és mtsai 2016). Prof. Martin Bastmeyer (Karlsruhe Institute of Technology, Németország) által rendelkezésünkre bocsájtott szilikon matricák segítségével egy 6 cm átmérőjű műanyag tenyészedényre (Orange Scientific; 4450200N) körülbelül 90 µm szélességű sávokban kontoroll (10 µg/ml laminin és 20 µg/ml fibronectin, Sigma-Aldrich) és vizsgálni kívánt ECM molekulákat (2 µg/ml agrin vagy 50 µg/ml endosztatin; R&D System) vittünk fel, majd 2 órán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk. Az ECM sávokra merőleges orientációban (6. ábra A) 7 napos csirke embrióból származó középbelet helyeztünk, majd kis mennyiségű szérummentes, penicillin-streptomocint tartalmazó DMEM tenyészmédiával fedtük be. Újabb 2 órás, 37°C-on történő inkubálást követően (ennyi idő alatt a bél hozzá tudott tapadni a műanyag tenyészedényhez) a tenyészethez 10 ng/ml GDNF tartalmú DMEM-et adtunk. Az entericus ganglionléc-eredetű sejtek sávokon történő migrációs távolságát 24 óra elteltével értékeltük (6. ábra).

Az entericus ganglionléc-eredetű sejtek migrációs képességét Chakraborty munkacsoportja által leírtak szerint is megismételtük (Chakraborty és mtsai 2015). A Wnt1;tdT-eredetű idegi sejtaggregátumokat 20 µg/ml fibronectinnel bevont felületen szérum-mentes DMEM-ben, illetve 20 µg/ml funkció-blokkoló agrin antitestet (Millipore, MAB5204) tartalmazó médiumban tenyésztettük. A sejt vándorlást ImageJ (National Institutes of Health) szoftver segítségével mértük. A látóteret 8 mezőre osztottuk, melyekben az idegi sejtaggregátum határa és az attól legmesszebb található Wnt1;tdT sejt közötti távolságot mértük. Összeállításoként 3-4 idegi sejtaggregátumot vizsgáltunk.



6. ábra: *In vitro* migrációs assay (“stripe choice assay”). (A) Az assay sematikus elrendezése. (B) A tenyészedény aljára nyomtatott ECM sávokon vándorló sejtek inverz mikroszkópos felvétele.

5. EREDMÉNYEK

A béltraktus embrionális fejlődésének karakterizálása során nyert korábbi eredmények alapján megállapítható, hogy a bélidegrendszer organogenezisét a mesenchymalis környezet és az epithelialis faktorok kölcsönhatásai szabályozzák. Az entodermális eredetű bélhámokban termelt Netrin serkenti a ganglionléc-eredetű sejtek plexus myentericusból submucosalis irányba történő migrációját és gátolja a ganglionléc-eredetű sejtek idő előtti apoptózisát (Jiang és mtsai 2003). Ezzel szemben a szintén hámeredetű Hedgehog fehérjék családjába tartozó Sonic hedgehog (Shh) morfogén szerepe kevésbé ismert. A Shh jelátvitel bélidegrendszer fejlődésében betöltött szerepét morfológiai (hisztokémia, immuncitokémia, kettős immunfluoreszcencia, konfokális mikroszkópia), sejtbiológiai (szervtenyésztés, retrovírus-mediált génexpresszió, migrációs assay) és fejlődésbiológiai (chorioallantois membrántenyésztés, testüregkiméra, szöveti rekombináció) módszereket ötvözve vizsgáltuk.

5.1. A Sonic hedgehog gátolja az embrionális vastagbél bélidegrendszerének fejlődését

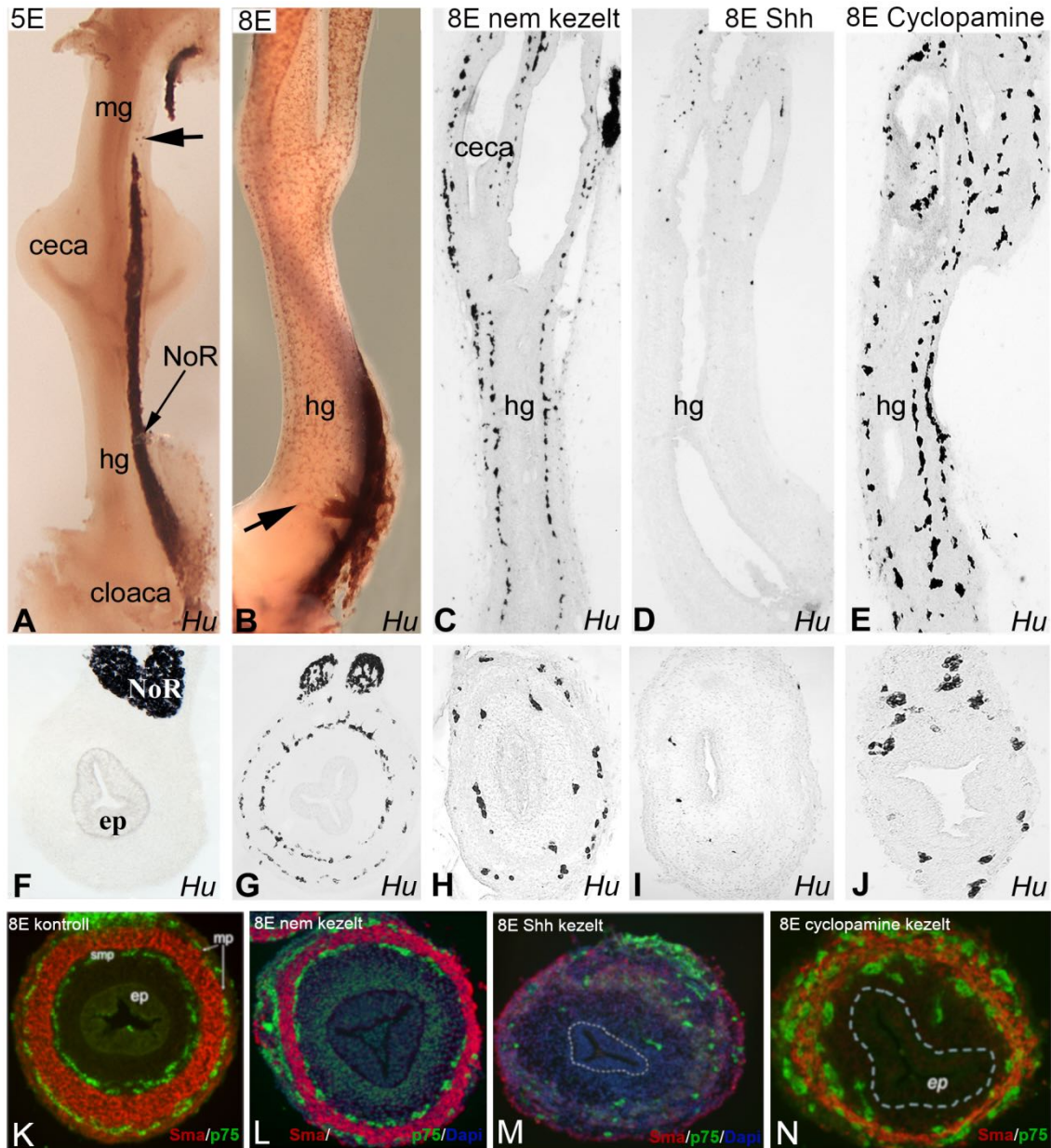
Munkánk során arra a korábbi *in vitro* kísérleti eredményre támaszkodtunk, ami szerint az előbél epitheliumából származó Shh faktor gátolja a gyomor bélidegrendszerének kialakulását (Sukegawa és mtsai 2000). Ennek a jelenségnek vékony és vastagbélben történő igazolására 5 napos csirke embriókból (5E) izolált közép és utóbelet tartalmazó bélszakaszokat 3 napon keresztül Shh fehérjét (2 µg/ml) vagy Hedgehog jelátvitelt gátló cyclopamine-t (2 µM) tartalmazó, I-es típusú kollagén alapú mátrixba ágyazva tenyésztettük. Az 5E csirke embrió teljes bélszakaszán végzett anti-Hu (korai neuron marker) wholemount immunfestéssel jelöltük a bélidegrendszer entericus neuronjait. A Hu antitesttel jelölt vándorló entericus neuron prekursorok ekkor még csak a középbél utolsó szakaszánál tartanak (7. ábra A, nyíl), míg a 8. embrionális napra már az utóbél disztális szakaszát is benépesítik (7. ábra B, nyíl). A kollagénben történő 3 napos szervtenyésztést követően készített hosszanti metszeteken a kontrollhoz hasonló állapot látható, azaz a disztális bélszakasz Hu⁺ sejtes kolonizációja végbement (7. ábra C). Ezzel szemben a kollagén gélhez adott Shh fehérje jelenlétében az utóbél területe aganglionotikus maradt (7. ábra D, I). Cyclopamine hatására a kolonizáció ugyan végbement, de a bél mesenchymájában ektopikusan elhelyezkedő, nagyobb

méretű ganglionok jelentek meg (7. ábra E, J). A ganglionléc-eredetű sejteket jelölő p75 (neurotrofin receptor) és simaizom specifikus alpha-simaizom aktin kettős immunfluoreszcens festése alátámasztja a Hu-val kapott eredményeket: kontroll (7. ábra K) és nem kezelt (7. ábra L) vastagbélben a két plexus mentén történő kolonizációval szemben a Shh kezelt vastagbélben hiányoznak a p75+ ganglionléc-eredetű sejtek (7. ábra M). A cyclopamine-nal kezelt (7. ábra N) és nem kezelt tenyészetek esetében a bélhali simaizom differenciálódás zavartalannak látszik, míg Shh hatására a vastagbél radiális szimmetria mentén történő tagozódása (mucosa, submucosa, tunica muscularis) és a simaizom fejlődése elmosódott szövettani képet mutatott (7. ábra M).

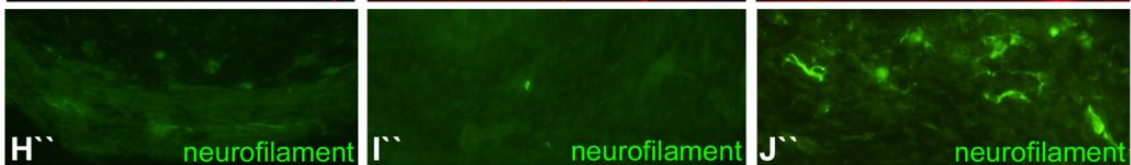
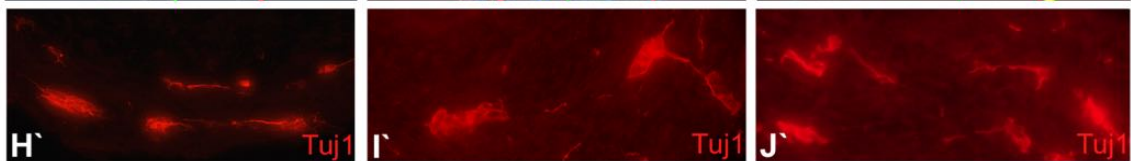
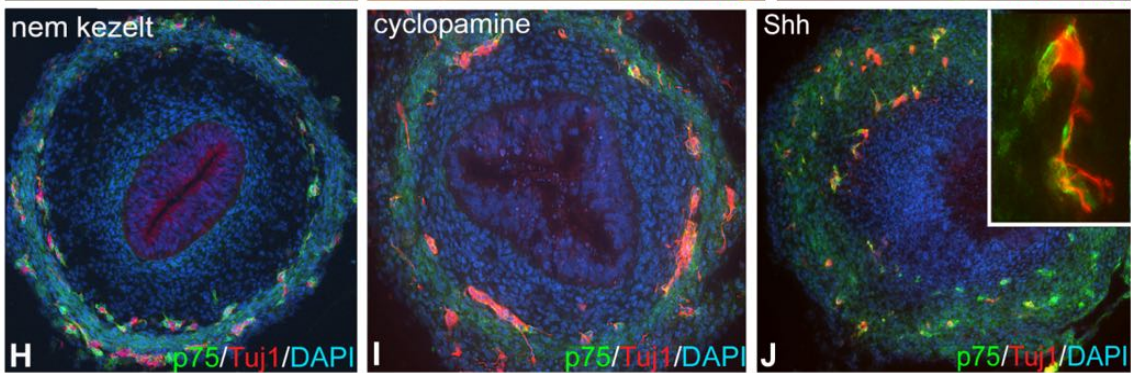
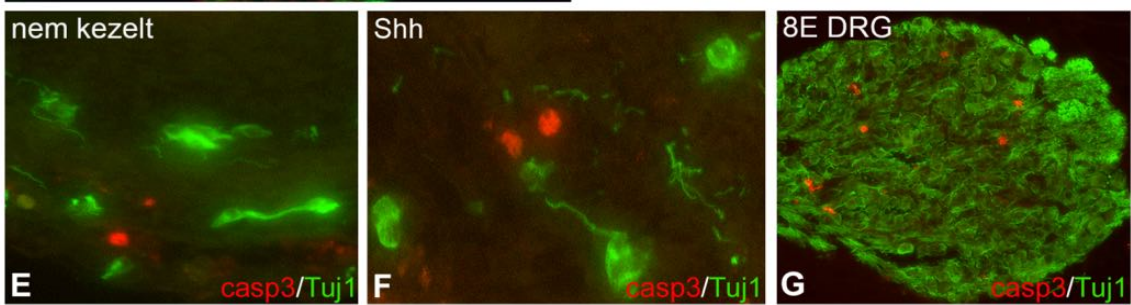
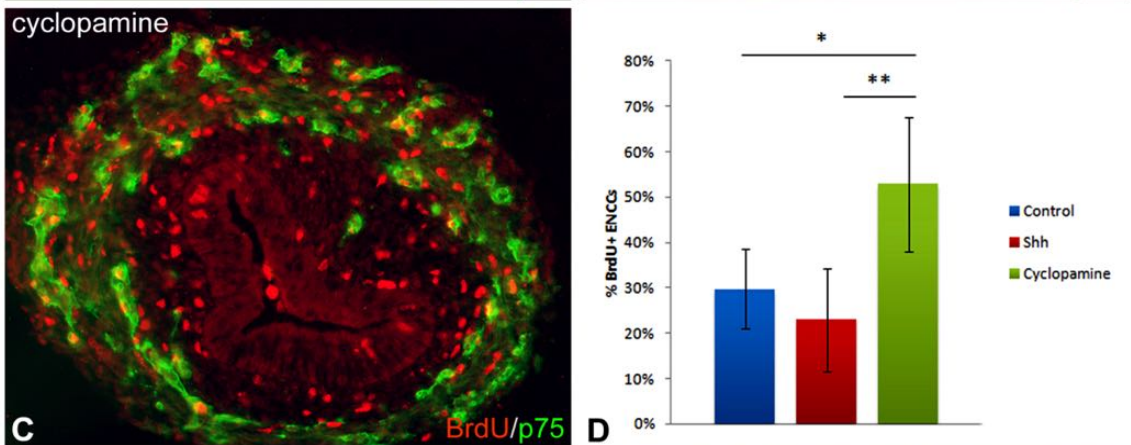
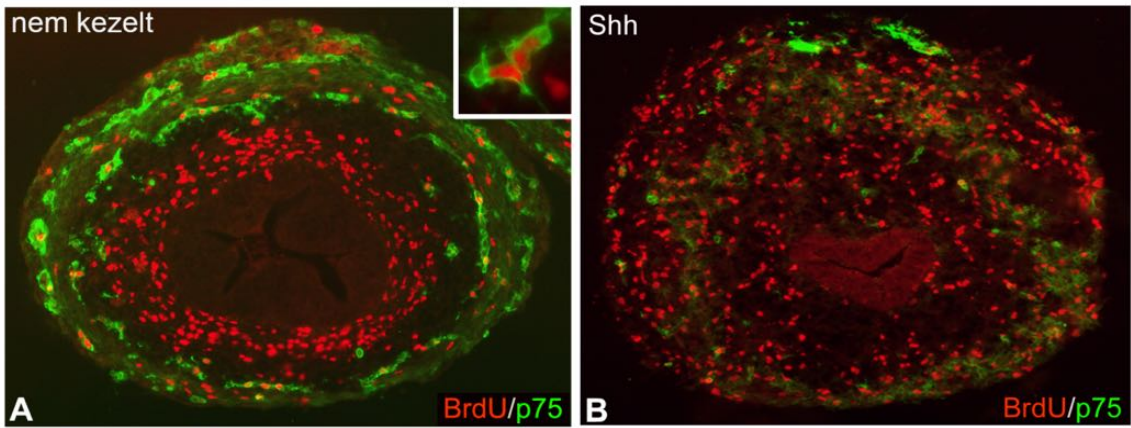
Kollagén tenyésztést követően a cyclopamine-nal kezelt bél makroszkópos átmérője a kontroll bélhez képest vékonyabb, míg a Shh kezelté vastagabb volt. Felvetődött a kérdés, hogy az Shh jelátvitelt célzó kezelések, hogyan befolyásolják a vastagbélben található sejtek proliferációját. Ennek megválaszolásához BrdU kezelést alkalmaztunk. A nem kezelt utóbélben BrdU pozitívítás elsősorban a submucosalis mesenchyma területén lévő sejtekben és a plexusok ganglionjait alkotó p75+ sejtek egy részében ($29.7 \pm 8.7\%$ -ukban) figyelhető meg (8. ábra A). A Shh kezelés általánosan stimulálta a bél mesenchyma sejteinek proliferációját (8. ábra B), viszont nem befolyásolta a p75+ ganglionléc-eredetű sejtek proliferációs arányát ($22.9 \pm 11.4\%$). Cyclopamine kezelés hatására a submucosalis mesenchyma sejtjeinek osztódása jelentősen lecsökkent, míg a p75+ enterális ganglionlécsejtek proliferációja nagymértékben növekedett (8. ábra C, $52.8 \pm 14.8\%$).

A proliferációs ráta meghatározásával párhuzamosan megvizsgáltuk a kezelések apoptózisra kifejtett hatását is. Az anti-kaspáz 3 expressziós mintázata alapján nem fordul elő apoptózis az Shh vagy Cyclopamine kezelt szervek bélidegrendszerében (8. ábra E, F). Apoptózis kimutatására pozitív kontrollként 5E embrió hátsó gyökér ganglionból készült metszete szolgált (8. ábra G). A Shh enterális neuronok differenciálódásra kifejtett hatását béta-III-tubulint felismerő Tuj1 és neurofilament markerek kettős immunfluoreszcens jelölésével határoztuk meg. Csirke embrióban, amint a p75+ entericus ganglionléc-eredetű sejtek kolonizálták a disztális bélszakaszt is (8E), megkezdődik a glia és neuron irányú differenciálódás. A differenciálódó korai neuronokat Tuj1 és Hu pozitívításuk, míg a késői típusúakat neurofilament expressziójuk alapján különíthetjük el (Nagy és mtsai 2012). A nem kezelt és a cyclopamine-nal kezelt teljes bélszakaszon, mindkét plexus területén találunk Tuj1+

sejteket, de neurofilamentum expresszió még nem figyelhető meg (8. ábra H-I''). Ezzel szemben a Shh jelenlétében tenyésztett bélben a kezelés hatására bekövetkező utóbél aganglionózist a caecum szakaszáig előforduló Tuj1+ enterális neuronok neurofilamentum koexpressziója jellemzi (8. ábra J-J'').



7. ábra: A Shh overexpressziója az utóbél aganglionózisához, míg jelátvitelének gátlása hiperganglionózishoz vezet. (A) 5E stádiumban az lefelől haladó entericus ganglionléc-eredetű sejtek a középbél területén járnak (nyíl), (B) míg a 8. embrionális napra már az utóbél disztális szakaszát is benépesítik (nyíl). 5 napos csirke embrióból izolált bélszakaszok, 3 napos kollagén tenyésztést követően: (C) nem kezelt, (D) Shh fehérje, (E) vagy cyclopamine hozzáadását követően. (A-E) Hosszmetszetek, (F-J) és keresztmetszetek. (D, I) Shh hozzáadása meggátolta az utóbél entericus ganglionléc-eredetű sejt kolonizációját, (E, J) míg a jelátvitel cyclopamine-nal történő gátlása nagy és ektopikus ganglionok megjelenéséhez vezetett. (K-N) Piros színnel jelöltük a simaizom aktint (Sma), zöld színnel mutattuk ki a neurotrofin receptoroként ismert p75 fehérjére pozitív ganglionléc-eredetű sejteket, kék szín pedig a sejtmagokat jelöli: (K) 8E kontroll embrió, (L) 5E+3 napos nem kezelt, (M) Shh-al és (N) cyclopamine-nal kezelt vastagbél keresztmetszete. *Ep*, epithelium; *hg*, utóbél; *mg*, középbél; *NoR*, Remak ideg; *mp*, myentericus plexus



8. ábra: A Shh és a cyclopamine kezelés hatása a ganglionléc-eredetű sejtek proliferációjára és differenciálódására. (A) 8E nem kezelt, (B) 5E+3 napos Shh kezelt és (C) 5E+3 napos cyclopamine kezelt embrionális bél keresztmetszete. Az osztódó sejtek kimutatására BrdU jelölést (piros) alkalmaztunk, míg a ganglionléc-eredetű sejteket p75-tel (zöld) jelöltük. (D) A kezelések során megfigyelt kettősen pozitív sejtek számadatai oszlopdiagramon. (E) A tenyésztett beleket aktivált kaszpáz 3-mal és Tuj1-gyel jelöltük, apoptózis sem a (E) kezelés nélküli sem a (F) Shh kezelt bél esetben nem figyeltük meg. (G) A pozitív kontrollként szolgáló hátsó gyökér ganglionban (DRG) jelentős apoptotikus aktivitás látható. Tuj1 és neurofilamentum festéssel a korai, illetve a késői neuronális differenciálódást vizsgáltuk. (H'-J') Tuj1+ neuronok az összes kezelt csoportban megjelentek, (H''-J'') neurofilamentum pozitivitás viszont csak a Shh kezelést követően láttunk. *P<0.002, **P<0.0004.

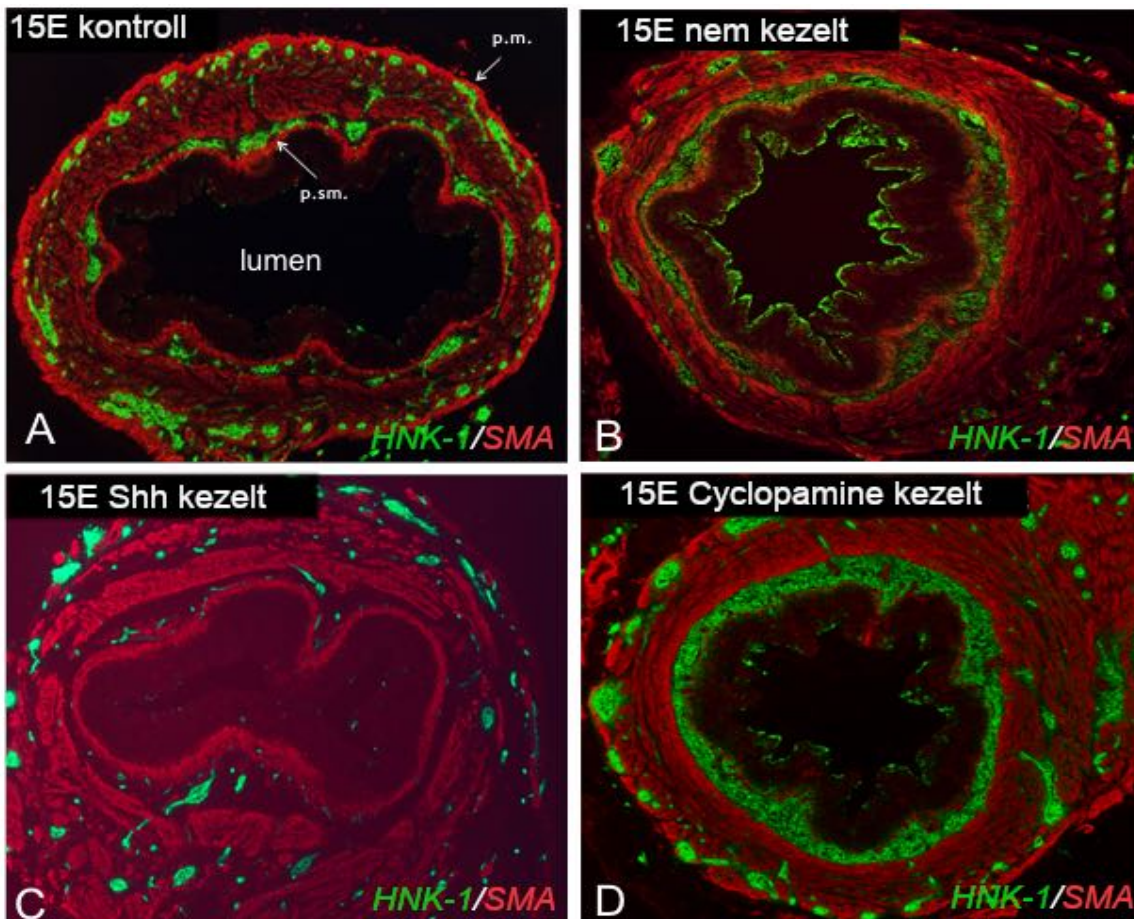
Összességében elmondható, hogy *in vitro* kollagén gélben tenyésztett embrionális bélben a Shh hatását a ganglionléc-eredetű sejtek korai neuronális irányú differenciálódása, csökkent proliferációs aktivitása és a kolonizáció zavara jellemzi.

5.2. A Sonic hedgehog jelátvitel hatásának *ex vivo* chorioallantois membránon történő vizsgálata a vastagbél idegrendszer embrionális fejlődése során

A 3-dimenziós kollagén tenyésztés hátránya, hogy mindössze 3 napon keresztül tartható fent, ugyanis ennyi idő eltelte után az embrionális szervek szöveti struktúrája elkezd szétesni. E miatt a morfogénekkal kezelt embrionális szervek 5-10 napos tenyésztésére chorioallantois membrán technikát alkalmaztunk. A Hedgehog jelátvitel *in vivo* tanulmányozására tervezett kísérlet kezdetén az *in vitro* vizsgálatban leírt protokoll szerint jártunk el, azaz az 5 napos csirke embriókból izolált vékony és vastagbél szakaszokat Shh, cyclopamine vagy Shh-funkció blokkoló antitest jelenlétében 3 napon keresztül kollagén gélben tenyésztettük. Itt fontos kiemelni, hogy ebben a stádiumban a csirke embrió ganglionléc-eredetű sejtjei a vékony és vastagbél határán, a caecum magasságában találhatóak, így a tenyésztés idején gélbe oldott Shh közvetlenül a vastagbél ganglionléc-eredetű sejtek általi kolonizációja idején érvényesül. Csirke és egémbriókban a bél ganglionléc-eredetű sejtjeit mindig a HNK-1, p75 vagy N-cadherin, L1CAM és Sox10 expresszió alapján határoztuk meg (Nagy és mtsai 2012).

A kollagén tenyésztést követően, steril körülmények között izolált vastagbél szakaszokat 9 napos embrió chorioallantois membránjára transzplantáltuk és további 7 napig inkubáltuk. Az inkubálás ideje alatt a bél vaszkularizálódik és jelentős méretbeli növekedése is megfigyelhető.

A kontrollnak számító 15 napos vastagbélhez hasonlóan a nem kezelt graftok tunica muscularisában is két plexus alakult ki. A lamina muscularis mucosae mindkét esetben jól elkülönül a tunica muscularistól (9. ábra A, B). Ezzel szemben a Shh hatására jelentős változás következett be. A tunica muscularis rétege fragmentált, a ganglionok száma és mérete jóval kisebb, egy-egy sejt alkotja őket, elhelyezkedésük rendezetlen, ektopikus (9. ábra C). A cyclopamine-nal kezelt bél metszete is eltérő képet mutat a kontrollhoz képest, a plexus submucosus, szinte összefüggő, hiperganglionotikus. Helyenként ektopikus ganglionok is előfordulnak. Érdekesség, hogy a lamina muscularis mucosae ebben az esetben majdnem teljesen hiányzik (9. ábra D). A Shh és a cyclopamine kezelés eredményei egyaránt azt sugallják, hogy a jelátvitelben bekövetkezett módosítás hatására irreverzibilisen megváltozik a bélrendszer fejlődése.

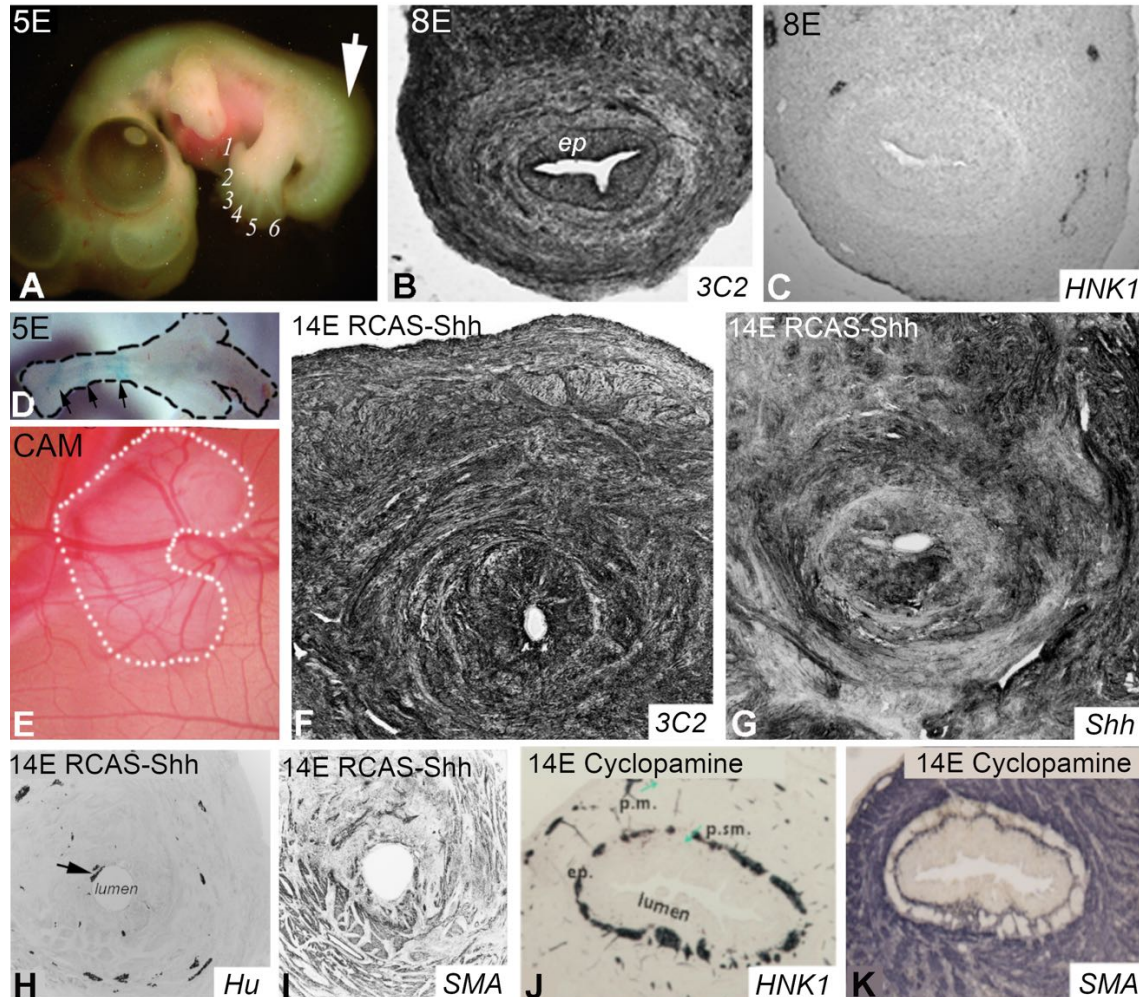


9. ábra: A Sonic hedgehog és a cyclopamine kezelés *ex vivo* hatásai. (A) 15 napos kontroll csirke embrió vastagbélének keresztmetszete. (B) 5 napos embrióból izolált, 3 napon át kollagénben és ezt követően 7 napig chorioallantois membránon tenyésztett vastagbél keresztmetszete (5+3+7E). (C) 5 napos embrionális vastagbél, 3 nap 3 μ M Shh-t tartalmazó gélben történő tenyésztés és 7 nap chorioallantois membrántenyésztés után (5+3+7E). (D) 5 napos embrionális vastagbél 3 nap cyclopamine-t tartalmazó gélben, majd 7 napig chorioallantois membránon történő tenyésztés után (5+3+7E). HNK-1 markerrel (zöld) jelöltük a ganglionléc-eredetű sejteket és alpha-simaizom aktinnal (piros) a simaizom sejteket. *pm*, *plexus myentericus*; *psm*, *plexus submucosus*

5.3. A Shh retrovírus-mediált overexpresszió *in vivo* aganglionózishoz vezet

A 3-dimenziós kollagén tenyésztés és az azt követő chorioallantois membrántranszplantáció hátránya, hogy a Shh morfogén és receptorának inhibitora csak rövid ideig fejt ki közvetlen hatását a vastagbél ganglionléc-eredetű sejtjeire, ezért a továbbiakban olyan módszert választottunk, ahol a kísérletesen bejuttatott Shh folyamatosan jelen van a fejlődő bélidegrendszer környezetében. A kísérlet során Shh gént tartalmazó RCAS (Rous-sarcoma vírusból módosított, replikáció kompetens vírus) retrovírus, valamint cyclopamine oldat mikroinjektálásával követtük nyomon a Shh kezelés hosszú távú hatását. A 2 napos embrionális stádiumban Shh-RCAS retrovírussal megfertőzött embrión 3 nap elteltével jelentős morfológiai eltérések mutatkoznak, mely főként polidaktíliában és farokbimbó rendellenességben nyilvánul meg (10. ábra A) (Riddle és mtsai 1993). A fertőzöttség az RCAS retrovírus P19-gag proteinjét felismerő 3C2 antitesttel követhető nyomon, ami az embrió 8 napos korára már a bélfal teljes szélességében kimutatható (10. ábra B) (Potts és mtsai 1987). A szervtenyészetben látott Shh-indukálta aganglionózissal (7. ábra D, I) megegyezően itt sem látunk utóbelet kolonizáló ganglionléc-eredetű sejteket (10. ábra C). Mivel a korai embrióba történő injektálását követően az embriók többsége a 8. napnál tovább nem élt túl, ezért kísérleteink során a hosszabb távú nyomonkövethetőség érdekében a Shh-RCAS vírust 5 napos csirke embrióból kiperarált közép és utóbelet tartalmazó bélszakaszok mezoderájába mikroinjektáltuk (10. ábra D), majd további 9 napig chorioallantois membránon tenyésztettük (10. ábra E). Az injektálást követően a retrovírus itt is beépült az osztódó mesenchyma sejtek genomjába, ami 24 órával később fokozott Shh termelést indukált. Az RCAS fertőzöttség a 3C2 antitesttel követhető nyomon, ez bizonyítja, hogy a Shh-vektor bekerült a transzfektált sejtekbe (10. ábra F). Anti-Shh festéssel a bélhámsejteken kívül termelődő Shh fehérje is detektálható, illetve a mesenchymalis sejtekben is intenzív Shh expressziót váltott ki (10. ábra G). A kísérletesen indukált magas Shh koncentráció serkentette a mesenchyma sejtek proliferációját, mely következtében a fertőzött bélszakasz megnagyobbodott. A vastagbél proximális területén kifejezett hipoganglionózis (10. ábra H) míg a disztálisabb területen aganglionózis alakult ki. A ganglionok száma és mérete jóval kisebb, elhelyezkedésük pedig rendezetlen, ektopikus: néhány Hu⁺ entericus neuron közvetlenül az epithelium alatt található (10. ábra H, nyíl). A Shh kezelés az izomszövet fejlődését is érintette; az egyes izomrétegek nem különültek el, fragmentált megjelenést mutattak (10. ábra I).

Ezzel szemben a cyclopamine kezelt bélszakaszt a submucosalis plexus hiperganglionózisa (10. ábra J), valamint az elszórtan egy-egy ektopikus gangliont is tartalmazó, rendellenesen megvastagodott izomréteg jellemezte (10. ábra K).

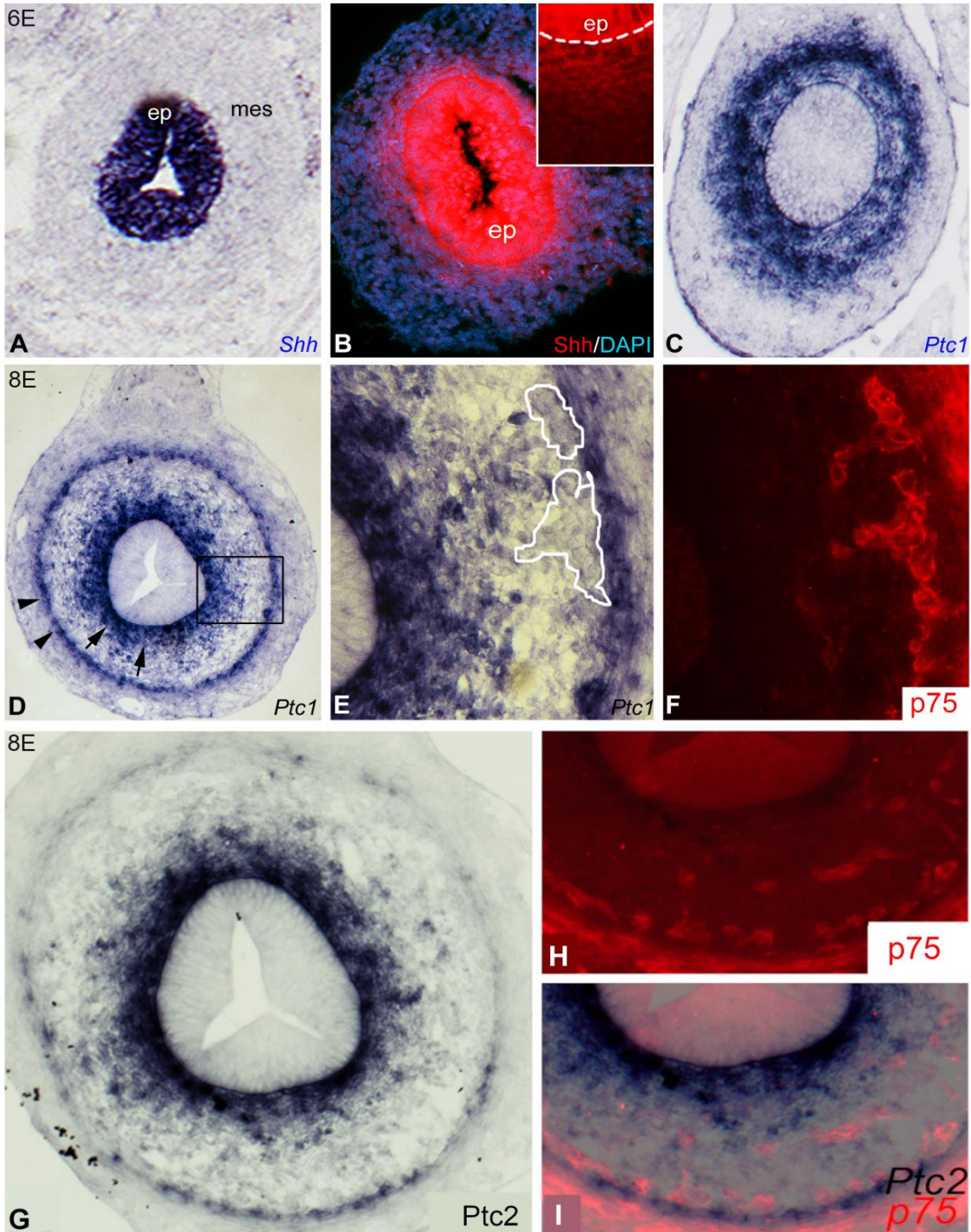


10. ábra: A Shh-RCAS és cyclopamine kezelés *in vivo* hatása: RCAS/cyclopamine injektálása + chorioallantois membrántenyésztése. (A) Az RCAS-Shh 2 napos csirke embrió utóbélének mezoderájába injektálását követő 5. embrionális napra hátsó végtagi polidaktilia (számok) és farokbimbó malformáció (nyíl) alakult ki. (B) A 2 naposan injektált embrió 8 napos korára az RCAS expresszió az utóbél teljes szélességére kiterjedt (C), ami a bélidegrendszer hipoganglionózisával illetőleg aganglionózisával jár együtt. (D) 5 napos csirke embrióból izolált vastagbél-caecum-disztális vékonybél részletének makroszkópos képe mikroinjektálás után. A nyilak az injektálás helyét mutatják, ami a 0,1%-os Fast Green festék kékeszöld színnel jelölt. Az izolált béldarabot 3-3 helyen (proximálisan, középen és disztálisan) injektáltuk. (E) A chorioallantois membrántenyésztés makroszkópos képe. (F) 9 nap chorioallantois membrántenyésztést követően az RCAS és a (G) Shh expresszió az utóbél teljes szélességére kiterjedt. (H) A vírusfertőzés következtében a 14 napos utóbélben hipoganglionózis és ektopikusan elhelyezkedő entericus ganglionléc-eredetű sejtek, valamint (I) megváltozott simaizom fejlődés figyelhető meg. (J) 14E cyclopamine kezelt vastagbél keresztmetszetén a plexus submucosus hiperganglionózisa (nyíl), valamint (K) megvastagodott simaizomréteg ábrázolódik. *Ep*, epithelium; *pm*, plexus myentericus; *psm*, plexus submucosus

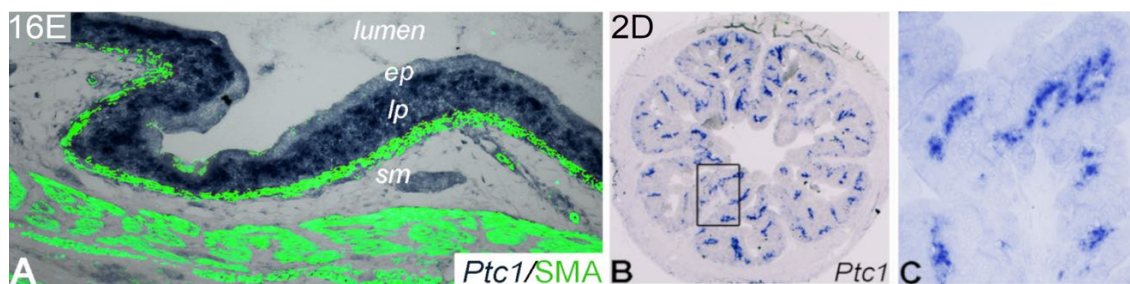
5.4. Shh és Ptc1 expressziója a bélidegrendszer kialakulása során

A Shh bélidegrendszerre kifejtett hatása felveti annak a lehetőségét, hogy a morfogén receptora (Ptc1) a ganglionléc-eredetű sejtekben is kifejeződik. *In situ* hibridizációs technikával kimutatható, hogy a 6 napos csirke embrió preganglionotikus utóbelének epitheliuma Shh-ot expresszál (11. ábra A). A Histochoice fixálással megnövelt festési intenzitásnak köszönhetően Shh fehérje immuncitokémiai jelölésére kirajzolódik a Shh gradiens mintázatot mutató subepithelialis elrendeződése (11. ábra B, nagyított). Zebrahal és egér embriók bélidegrendszerének vizsgálata szerint a Ptc1 expresszió a hám alatti mesenchyma mellett a ganglionléc-eredetű sejtekben is jelen van (Fu és mtsai 2004, Reichenbach és mtsai 2008). Ugyanakkor az egérben kapott eredmények ellentmondásosak; Ptc1-LacZ transzgenikus egér bélidegrendszeri sejtjeiben Ptc1 expresszió nem figyelhető meg (Kolterud és mtsai 2009). Csirke embrióban a Ptc1 receptor *in situ* hibridizációja szintén az epithelium alatti, mesenchymalis kifejeződést mutatott (11. ábra C) és ezen felül Ptc1 expresszió a bél mesenchyma külső rétegében is megfigyelhető volt (11. ábra D). Feltételeztük, hogy a külső rétegben mutatott Ptc1 expresszió a myentericus plexus területének feleltethető meg. Ptc1 *in situ* hibridizáció (11. ábra D, E) és a ganglionléc-eredetű sejteket jelölő, p75 immunfluoreszcens festés (11. ábra F) kombinációja alapján az *in situ* hibridizáció kromogénje nem fed át az immunfluoreszcens jellel (Young és mtsai 1998, Nagy és mtsai 2012), azaz a Ptc1 nem fejeződik ki a bélidegrendszer sejtjeiben.

Ezt folytatva, az utóbél fejlődésének későbbi stádiumaiban is megvizsgáltuk a két molekula (Ptc1 és p75) expresszióját. A 16E stádiumra megváltozik a Ptc1 expresszió, a submucosa rétegben már nem fejeződik ki, csak a hám és a muscularis mucosae közötti lamina propria területén figyelhető meg (12. ábra A). A kikelést követően a vastagbél Ptc1 expressziója a subepithelialis sejtek egy-egy csoportjára korlátozódik (12. ábra B, C). Igazoltuk, hogy a Shh másik receptora a Ptc2 sem fejeződik ki a p75+ ganglionléc-eredetű sejtekben (11. ábra G-I).



11. ábra: A Shh és receptorainak expressziója a fejlődő csirke utóbélben. A Shh és a Ptc1 kifejeződését (A-C) 6 és (D, E) 8 napos csirke embrió utóbélében vizsgáltuk. (A) *In situ* hibridizációval kimutatható az epithelium Shh transzkripciója, amely immunfluoreszcensen megjelölve (B) a subepithelialis mesenchyma irányába grádiens szerinti expressziós mintázatot mutat (bekeretezett, kinagyított részlet; a szaggatott vonal az epithelium bazális membránját jelöli). (C) 6E utóbél *in situ* hibridizációja során a Ptc1 expressziója a subepithelialis mesenchymában mutatható ki. 8E utóbél Ptc1 *in situ* (D, E) és p75 immunfluoreszcens (F) kettős jelölésekor a p75+ entericus ganglionléc-eredetű sejtek és a Ptc1 expresszió nem fed át [(E) és (F) a (D) képen bekeretezett területről kinagyított részlet]. Az (E) képen körülírt terület megfeleltethető az (F) kép p75+ submucosalis ganglionjának. (G) 8 napos embrió utóbélében a Ptc2 transzkripció a subepithelialis és a külső mesenchyma területén mutatható ki. (H, I) A Ptc2 (*in situ*) és p75 (immunfluoreszcens) kettős jelölés nem fed át. *Ep*, epithelium; *mes*, mesenchyma

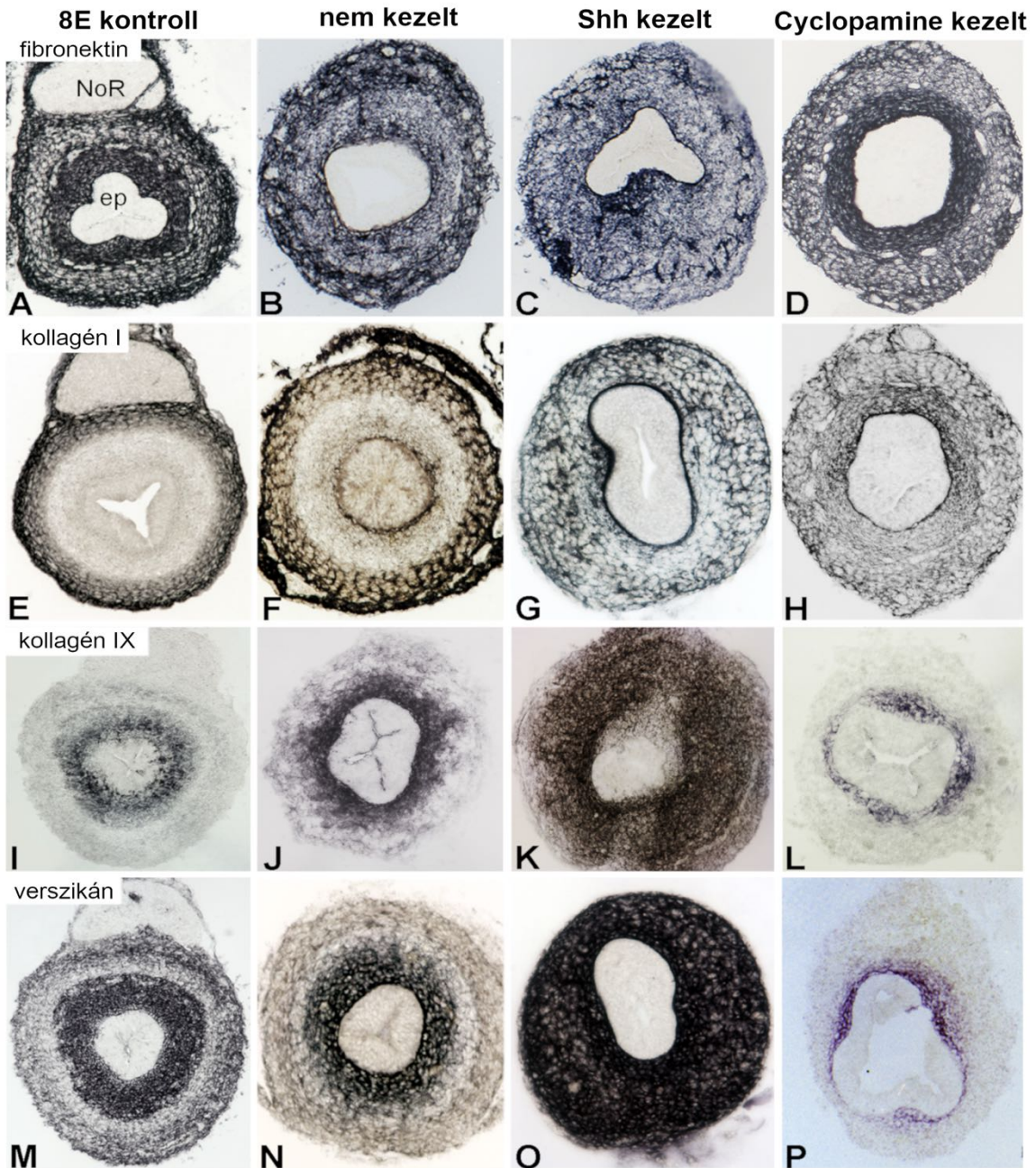


12. ábra: A Ptc1 expressziója a késő embrionális és a posztnatális csirke utóbélben.
Ep, epithelium; lp, lamina propria; sm, submucosa

5.5. A Shh hatása a bél extracelluláris mátrix mintázatára

A Ptc1 receptor expressziójának ganglionléc-eredetű sejteken megfigyelt hiánya (11. ábra D-F) azt sugallja, hogy a Shh bélidegrendszer fejlődését gátló hatása csak közvetett módon, a mikrokozony megváltozásán keresztül érvényesülhet. Mivel korábbi kísérleteink alkalmával a Shh kezelés jelentős mértékben befolyásolta a bélcső mesenchymalis sejtjeinek differenciálódását (7. ábra M), ezért következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a Shh milyen hatást fejt ki a bélcső mátrixfehérjék expressziójára. Ehhez olyan mátrix fehérjéket választottunk, amelyekről irodalmi adatok alapján már ismert, hogy a korai ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását permisszív vagy gátló módon befolyásolják. A bél ECM expressziós mintázatának karakterizálásához kollagén I, III, VI, IX, XVIII, laminin, fibronectin, verszikán, tenaszcin, agrin, heparán-szulfát (HSPG) és kondroitin-szulfát proteoglikán (CSPG) immunfestését végeztük el Shh, illetve cyclopamine jelenlétében tenyésztett utóbelek fagyasztott metszetein. Kimutattuk, hogy a fibronectin intenzív fibrilláris festődéssel egyenletesen expresszálódik a bél mesenchymájában és ezt az elrendeződését a különböző kezelések sem befolyásolták (13. ábra A-D). Hasonlóan nem történt szignifikáns változás a kollagén III, VI, XVIII, laminin, agrin és a heparán-szulfát proteoglikán expressziós mintázatában sem. A kollagén I expressziója a 8 napos kontroll és a nem kezelt embrióban a mesenchyma külső rétegére koncentrálódik (13. ábra E, F), de ezzel ellentétben a Shh vagy cyclopamine kezelt utóbélben jelentősen megváltozott a kollagén I eloszlási mintázata; mindkét esetben egyenletesen, a bélfal teljes szélességében kimutatható volt (13. ábra G). A legjelentősebb, Shh által indukált változást a kollagén IX, a verszikán és a CS-56 esetében figyeltük meg. Ezekről a CSPG családba tartozó fehérjékről ismert, hogy gátolják a velőcsőből kivándorló korai ganglionléc-eredetű sejtek migrációját (Ring és mtsai 1996, Dutt és mtsai 2006). A CSPG-ok normál esetben a bélcső mesenchymának belső rétegében fejeződnek ki (13. ábra I, J, M, N), viszont

Shh kezelés hatására mind a kollagén IX mind a verszikán expressziója megnövekedett és a teljes bélfalban egyenletesen kiterjedt expressziót mutatott (13. ábra K, O). Ezzel ellentétben a cyclopamine kezelés lecsökkentette a CSPG típusú mátrixfehérjék expresszióját, a verszikán és kollagén IX immunreakciója csak a subepithelialis mesenchymalis régióra korlátozódott (13. ábra L, P).

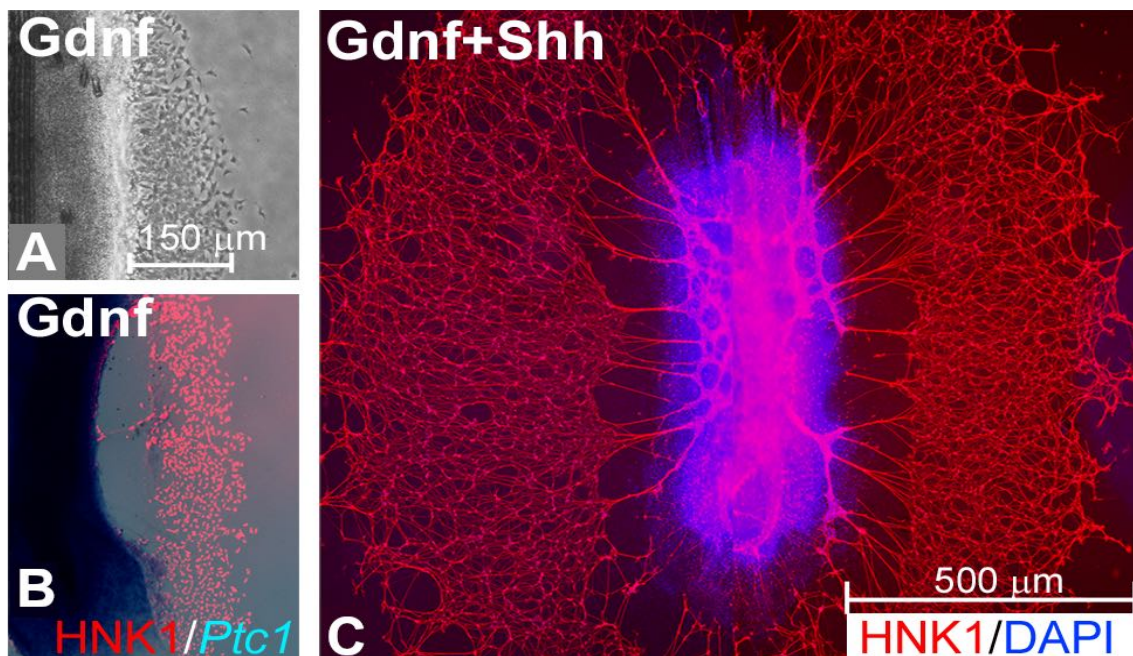


13. ábra: A Shh expresszió megváltozása módosítja a bél extracelluláris mátrix mintázatát. (A, E, I, M) 8 napos csirke embrió utóbélében számos mátrix fehérje expressziós mintázatát vizsgáltuk, majd hasonlítottuk össze 5 napos embrionális bél 3 napig különböző kísérleti összeállításokban tenyésztett utóbél szakaszaival: (B, F, J, N) nem kezelt, (C, G, K, O) Shh fehérje (D, H, L, P) és cyclopamine gélhez adását követően. (A-D) A fibronektin, (E-H) a kollagén I, (I-L) a kollagén IX és (M-P) a verszikán V0/V2 expressziója az utóbél középső szakaszának keresztmetszeti ábráin. *Ep*, epithelium; *NoR*, Remak ideg

5.6. A Shh közvetlenül nem gátolja a ganglionléc-eredetű sejtek bélben történő vándorlását

Annak alapján, hogy a Shh képes megváltoztatni az ECM expresszióját, Ptc1-receptora pedig nem fejeződik ki a ganglionléc-eredetű sejteken, arra következtethetünk, hogy a Shh nem közvetlenül a ganglionléc-eredetű sejteken keresztül, hanem indirekt úton, a mikrokörnyezet megváltoztatásával okoz aganglionózist.

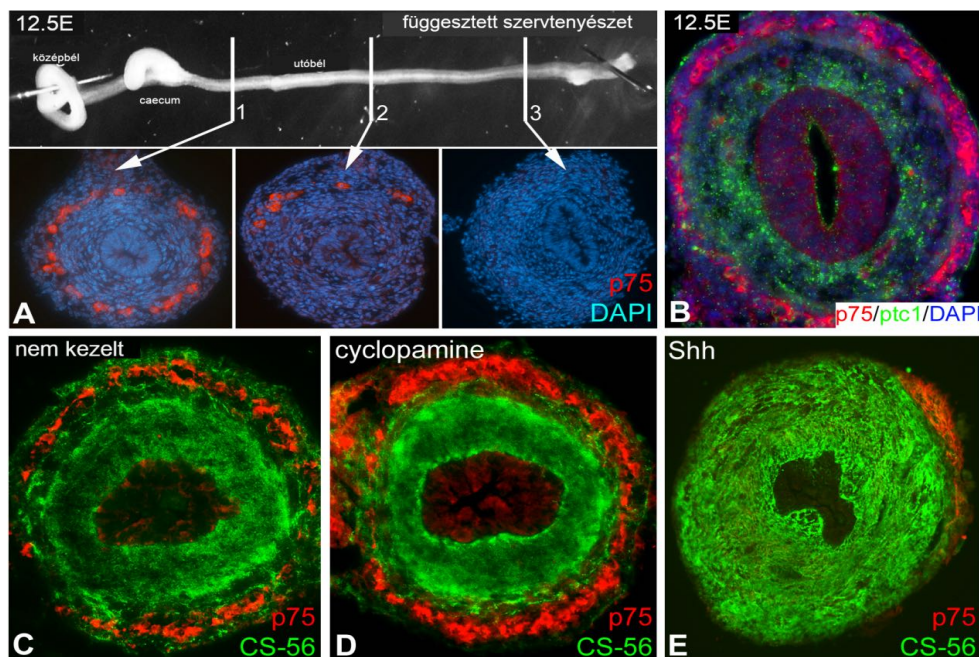
A Shh ganglionléc-eredetű sejtekre kifejtett direkt vagy indirekt hatásának eldöntésére 6 napos középbelet fibronektinnel bevont felszínen GDNF (10 ng/ml) jelenlétében tenyésztettünk. 24 órával a bélcső kiültetése után a ganglionléc-eredetű sejtek a bélfaltól mintegy 150 μm távolságra vándoroltak (14. ábra A). Ezután a GDNF további jelenléte mellett, szolúbilis Shh (2 $\mu\text{g/ml}$) fehérjét adtunk a sejttenyésztő médiumhoz, majd az explantátumot további 48 órán keresztül tenyésztettük. Az Shh jelenléte ellenére azt tapasztaltuk, hogy tovább folytatódott a ganglionléc-eredetű sejtek GDNF kemoattraktáns fehérjére adott vándorlása és egészen 500 μm távolságot tettek meg a fibronektinnel bevont aljzaton (14. ábra C). Ennek alapján kijelenthető, hogy a Shh fehérje a mesenchyma hiányából adódóan nem tudja kifejteni gátló hatását a vándorló ganglionléc-eredetű sejtekre.



14. ábra: *In vitro* a Shh nem gátolja a tenyésztett ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását. (A) GDNF hatására a 6 napos középbeletből 24 óra elteltével kifejezett sejtvándorlás figyelhető meg. (B) A Ptc1 expressziója a vándorló HNK-1+ ganglionléc-eredetű sejteken nem mutatható ki. (C) A 24 óra elteltével hozzáadott Shh nem gátolta a ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását.

5.7. A Shh jelátvitel hatása az egér bélidegrendszerének fejlődésére

A csirke embrióból származó megfigyeléseinket egér embrionális bélel végzett kísérletekkel is alátámasztottuk. Munkánk kezdetén p75 ellenanyag segítségével karakterizáltuk az egér colorectalis bélidegrendszerének fejlődését. A vándorló ganglionléc-eredetű sejtek 12.5 napos egér embrióban érik el az utóbél középső szakaszát, ami csirkében 7 napos embrióknak feleltethető meg (15. ábra A). Egér embrióban, hasonlóan a madár embrióhoz a Ptc1 receptor a mesenchyma belső rétegében expresszálódik, viszont a p75+ ganglionléc-eredetű sejteken nem fejeződik ki (15. ábra B). A korábban bemutatott kollagén gélben végzett tenyésztést 12.5 napos egér embrió utóbelével is megismételtük. A ganglionléc-eredetű sejtek a nem kezelt mintához (15. ábra C) hasonlóan cyclopamine jelenlétében (15. ábra D) is képesek kolonizálni a teljes utóbelet (beleértve annak disztális szakaszát is). Ez utóbbi kezelés hatására lecsökkent a CSPG-ok eloszlása: a CS-56 expressziója a mesenchyma belső területére koncentrált (15. ábra D). Shh fehérje hozzáadása a disztális utóbelben aganglionózist eredményezett, amivel párhuzamosan a teljes mesenchymára kiterjedő CS-56 expresszió volt megfigyelhető (15. ábra E).



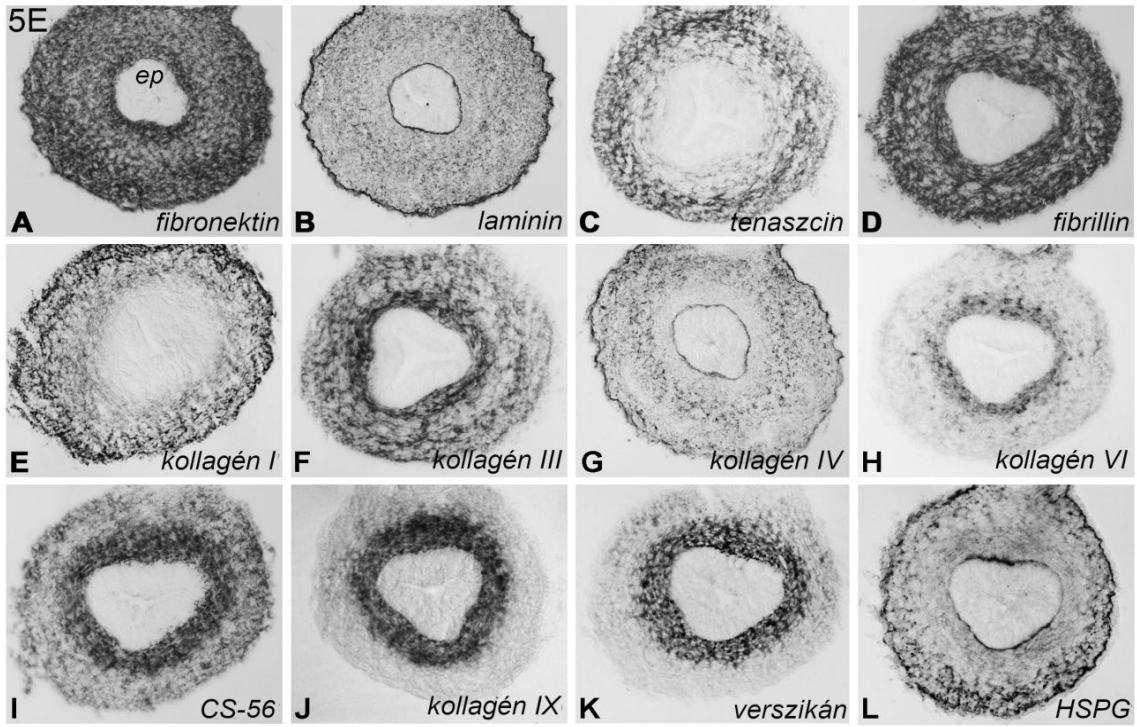
15. ábra: A Shh jelátvitel hatása az egér bélidegrendszerének fejlődésére. (A) 12.5 napos egér embrióban a vándorló p75+ entericus ganglionléc-eredetű sejtek az utóbél középső szakaszánál járnak (2. metszet), ekkor a disztális utóbél még aganglionotikus (3. metszet). (B) A p75+ entericus ganglionléc-eredetű sejtekkel a Ptc1 expresszió nem mutat átfedést. 48h elteltével az entericus ganglionléc-eredetű sejtek elérik a disztális utóbelet. (C) A kontroll, nem kezelt kollagén gélben tenyésztett bél CS-56 expressziós mintázata. (D) A tenyésztethez hozzáadott cyclopamine nem gátolta az entericus ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását. Hatására a bélfal külső rétegének kontrollhoz viszonyított CS-56 expressziója lecsökkent és főként a mesenchyma belső területére koncentrált. (E) A Shh jelenléte disztális aganglionózishoz vezetett. Ezzel párhuzamosan a mesenchyma diffúz CS-56 immunfestődést mutat.

5.8. Az embrionális és a felnőtt bél entericus ganglionjait HSPG fehérjék veszik körül

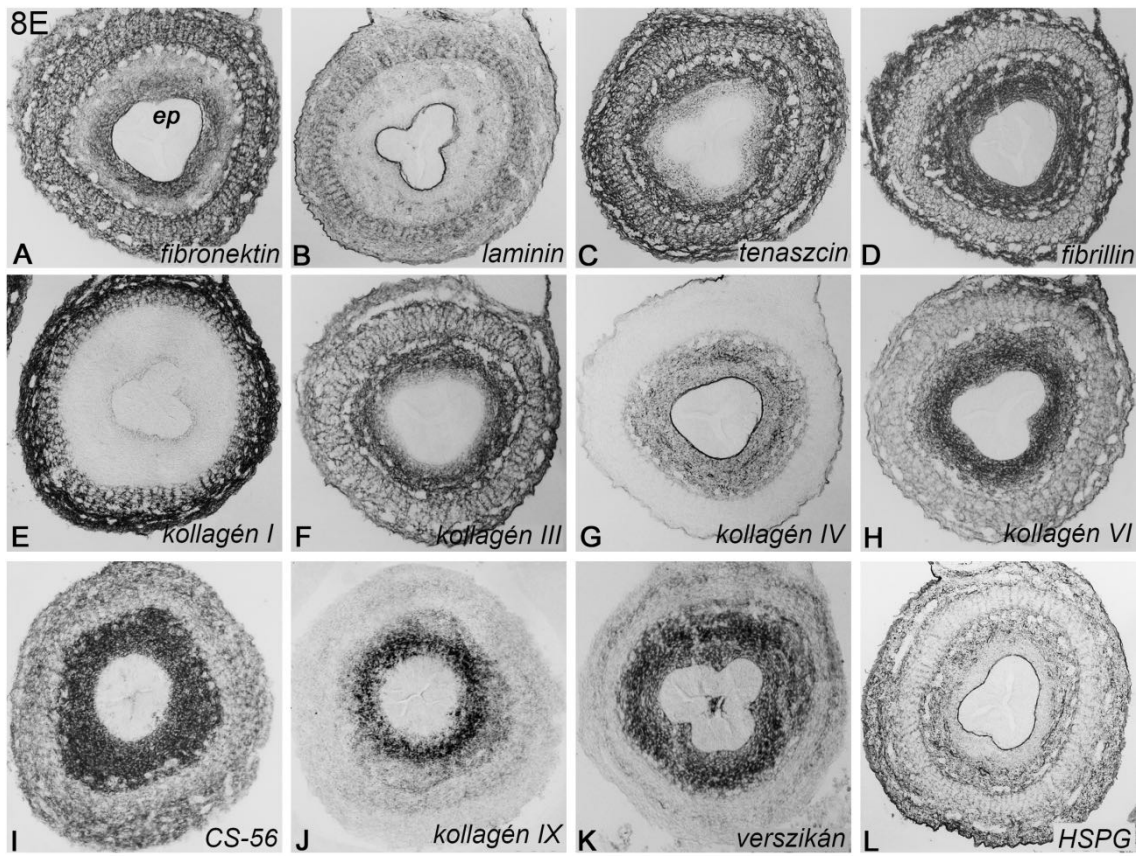
A bélidegrendszer és az ECM kapcsolatát célzó kutatásunk második felében 15 különböző ECM fehérje expresszióját vizsgáltuk a vastagbél bélidegrendszerét létrehozó ganglionléc-eredetű sejtek kolonizációja előtt (5E), alatt (8E) és befejeződése után (14E).

A ganglionléc-eredetű sejtek utóbélbe történő lépését megelőzően (5E stádium) a fibronektin, a laminin, a tenaszcin és a fibrillin diffúz mesenchymalis kifejeződése figyelhető meg (16. ábra A-D). A kollagén I, a kollagén III és a kollagén IV esetében is kiterjedt expressziót látunk (16. ábra E-G). Kiemelendő, hogy a kollagén I inkább a mesenchyma külső, míg a kollagén III annak belső területére koncentrálódik (16. ábra E, F). A kollagén VI, a CSPG típusú molekulákat általánosan jelölő CS-56, a kollagén IX és a verszikán specifikus ellenanyagok kifejezetten a mesenchyma belső területén jelöltek (16. ábra H-K). Ezzel szemben a HSPG-okat a bélfal külső rétegében megfigyelhető diffúz kifejeződés jellemzi (16. ábra L).

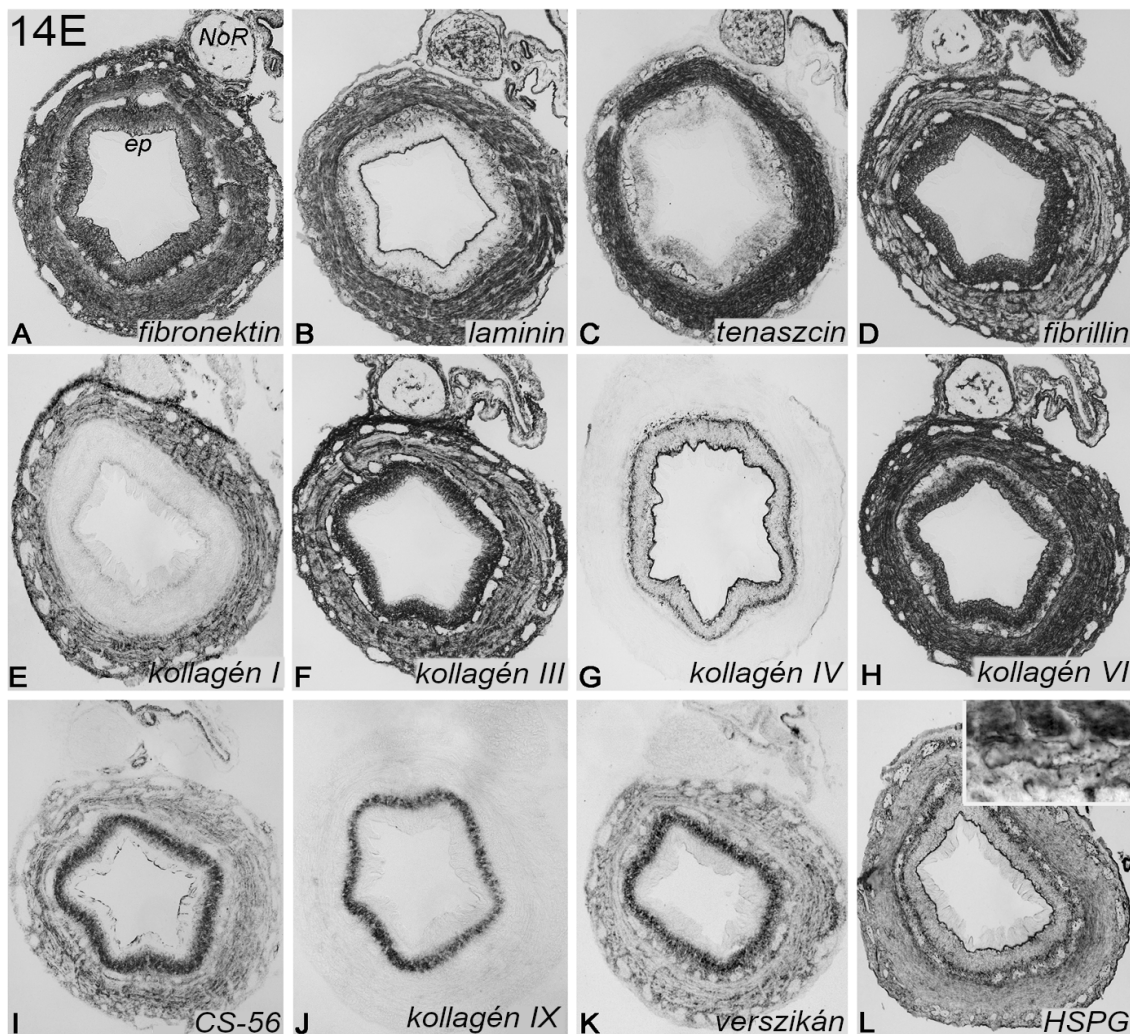
Ez a mintázat a bélidegrendszeri kolonizáció végén, a 8. és a 14. embrionális napra, jelentősen átalakul (17. és 18. ábra). A kezdetben diffúz tenaszcin expressziója a muscularis propria rétegére, valamint az entericus ganglionokat körülvevő területekre korlátozódik (18. ábra C) (Akbareian és mtsai 2013). A tenaszcinhoz hasonlóan az entericus ganglionok körüli expressziós mintázatot a HSPG-ok esetében is megfigyeltük. Ez a jelenség 8 napos stádiumban már észlelhető (17. ábra L), azonban a 14. napra kifejezetten a ganglionok körül koncentrálódik (18. ábra L).



16. ábra: Extracelluláris mátrix mintázata 5 napos csirke embrió utóbelében. *Ep*, epithelium



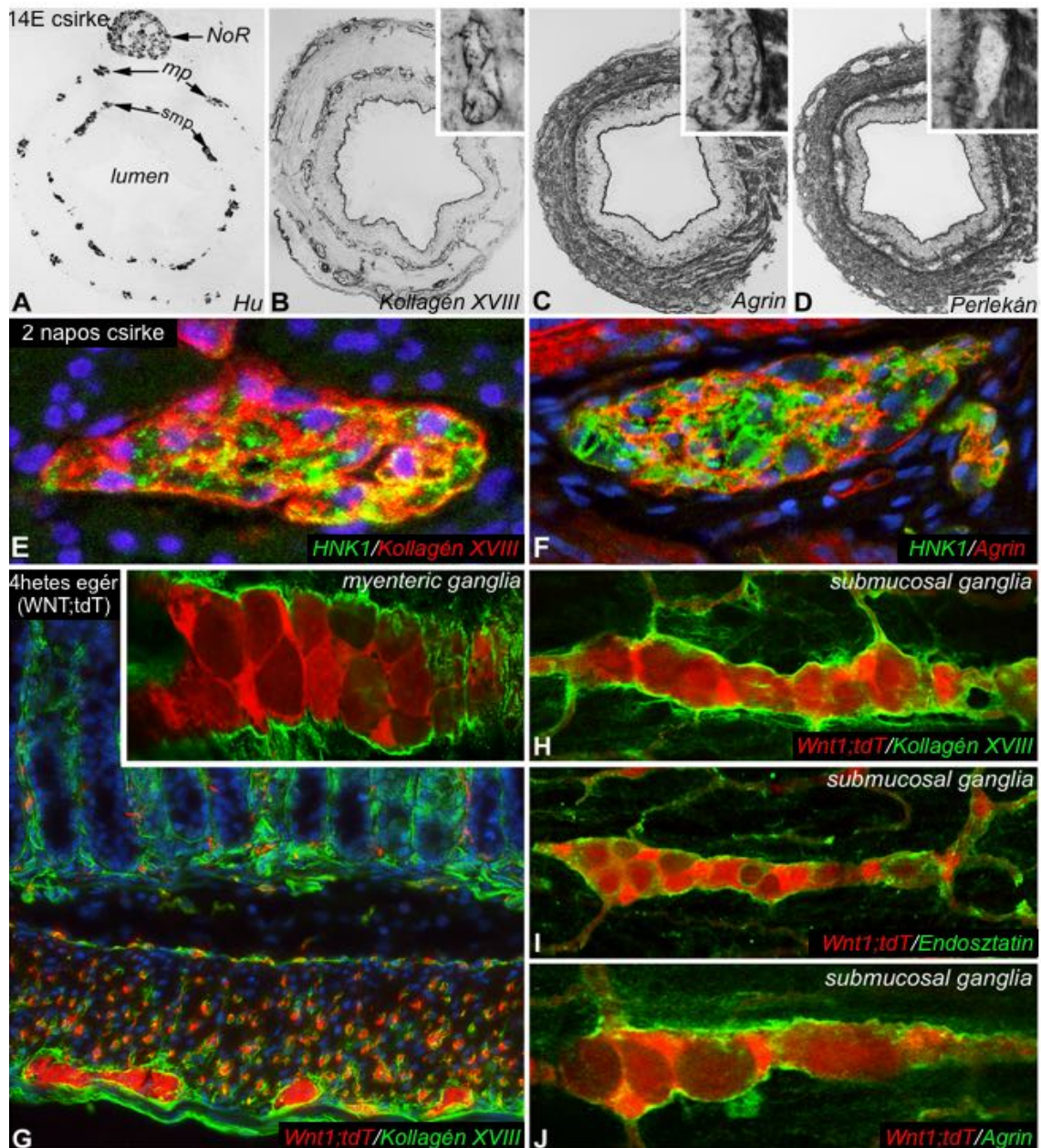
17. ábra: Extracelluláris mátrix mintázata 8 napos csirke embrió utóbelében. *Ep*, epithelium



18. ábra: Extracelluláris mátrix mintázata 14 napos csirke embrió utóbelében. *Ep*, epithelium; *NoR*, Remak ideg

A HSPG típusú szekrécións ECM molekulák közé a perlekán, agrin és a kollagén XVIII tartozik. 14 napos csirke embriók vastagbeléből készült sorozatmetszeteket Hu, kollagén XVIII, agrin és perlekán ellenes markerekkel jelöltük. A Hu ellenanyag a differenciálódó plexus myentericus és submucosalis neuronjait jelöli (19. ábra A). Kollagén XVIII expresszió a ganglionoknak megfelelő területekben figyelhető meg (19. ábra B). Az agrin és a perlekán diffúzan kifejeződik a mesenchymában, de a kettő közül az agrin a ganglionok körül koncentrálnó immunreaktivitást mutat (19. ábra C). A kollagén XVIII-nak és az agrinnak ez a specifikus, periganglionáris expressziós mintázata posztnatális korban is megmarad; 2 napos csirke utóbelében a ganglionokhoz asszociáltan és intraganglionárisan expresszálódnak (19. ábra E, F). Vizsgálatunkat emlősökre is kiterjesztettük. A ganglionléc-eredetű sejtek azonosítására *Wnt1;tdT*

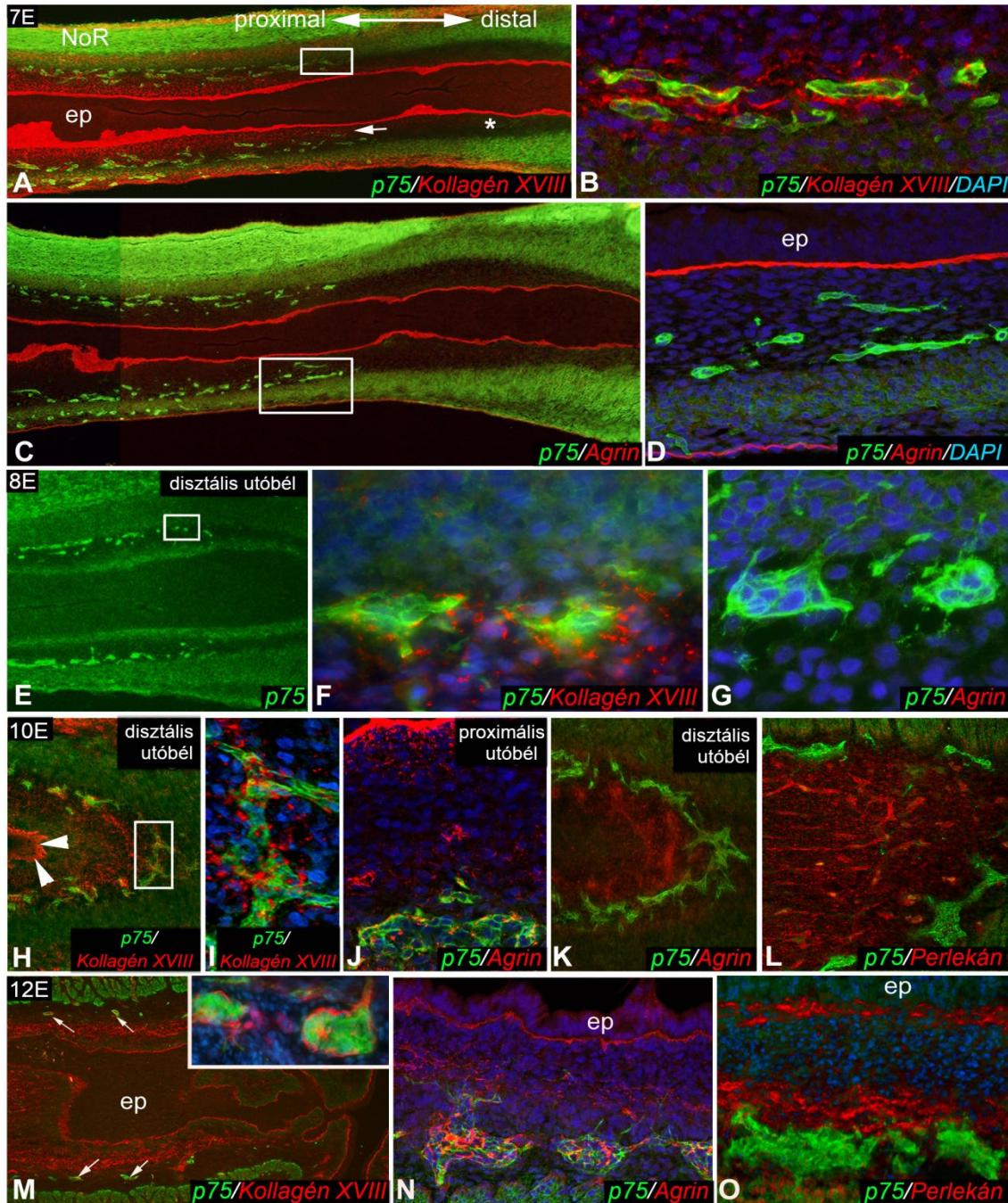
típusú transzgenikus egereket alkalmaztunk. Ebben a modellben minden ganglionlécből származó sejt piros fluoreszcenciát mutat. A *Wnt1;tdT* egérből származó vastagbél metszeteket teljes hosszúságú kollagén XVIII-ra (19. ábra G, H), endosztatinra (kollagén XVIII C-terminális szekvenciáját jelöli) (19. ábra I) és agrinra specifikus ellenanyagokkal (19. ábra J) jelöltük. Mindhárom fehérje esetében kifejezett ganglion körüli expressziót figyeltünk meg.



19. ábra: A csirke és az egér bélidegrendszer HSPG-okat expresszál. 14 napos csirke embrióból származó vastagbél keresztmetszetének (A) Hu, (B) kollagén XVIII, (C) agrin és (D) perlekán specifikus immunfestése. A kollagén XVIII (E) és az agrin (F) a posztnatális 2 napos csirke vastagbélének HNK-1+ ganglionjai körül és azokon belül is kifejeződik. A 4 hetes *Wnt1;tdT* egér vastagbélének (G-H) kollagén XVIII, (I) endosztatin és (J) agrin specifikus immunfestése a HSPG-ok jellegzetes periganglionáris (*Wnt1*+ entericus ganglionléce-eredetű sejtek körüli) expresszióját mutatja. *Mp*, *plexus myentericus*; *smp*, *plexus submucosalis*, *NoR*, *Remak ideg*

5.9. A legelől vándorló entericus ganglionléc-eredetű sejteket kollagén XVIII veszi körül, az agrin expresszió azonban csak a fejlődő bélidegrendszer későbbi stádiumában jelenik meg

A bélidegrendszer fejlődése és a HSPG molekulák közötti tér-időbeli kapcsolatot 7, 8, 10 és 12 napos csirke embrió utóbélének hosszmeteszetein végzett immunfluoreszcencia technikával vizsgáltuk. 7 napos embrióban a legelől vándorló p75+ ganglionléc-eredetű sejtek az utóbél középső szakaszánál járnak (20. ábra A, C). A vándorló sejtek körül már jelen van a kollagén XVIII (20. ábra B). Érdekes megfigyelés, hogy a ganglionokat tartalmazó bélszakasz hám alatti mesenchymájában ugyancsak látunk kollagén XVIII expressziót (20. ábra A, nyíl), azonban a disztálisabb, még ganglionmentes területen kollagén XVIII nem figyelhető meg (20. ábra A, csillag). Ebben a stádiumban az agrin csak a hám bazális membránjában expresszálódik, a ganglionok körül nincs agrin pozitivitás (20. ábra D). Az embrió 8 napos korára a legelől haladó ganglionléc-eredetű sejtek az utóbél disztális szakaszánál járnak (20. ábra E), ahol a sejteket továbbra is intenzív kollagén XVIII expresszió veszi körül (20. ábra F), de agrin jelenléte még mindig nem igazolható (20. ábra G). Tíz napos embrióban a kollagén XVIII expressziója még markánsabban jelenik meg (20. ábra H, I), illetve ekkor látunk először ganglion körüli agrin pozitivitást is, ami azonban csak az utóbél proximális szakaszán figyelhető meg (20. ábra J), a disztális terület ganglionléc-eredetű sejtjei körül továbbra sem látni agrin expressziót (20. ábra K). A 12. embrionális napra már a teljes vastagbél kolonizációja befejeződik és kezdetét veszi a gangliogenezis is (20. ábra M, kinagyítva). A kollagén XVIII és az agrin expresszió is a teljes utóbél területére kiterjed. A ganglionok körül és azokon belül is mindkét HSPG fehérje megtalálható (20. ábra M, N). A HSPG-ok harmadik tagja, a perlekán egyik stádiumban sem expresszálódik az entericus ganglionléc-eredetű sejt körül (20. ábra L, O).

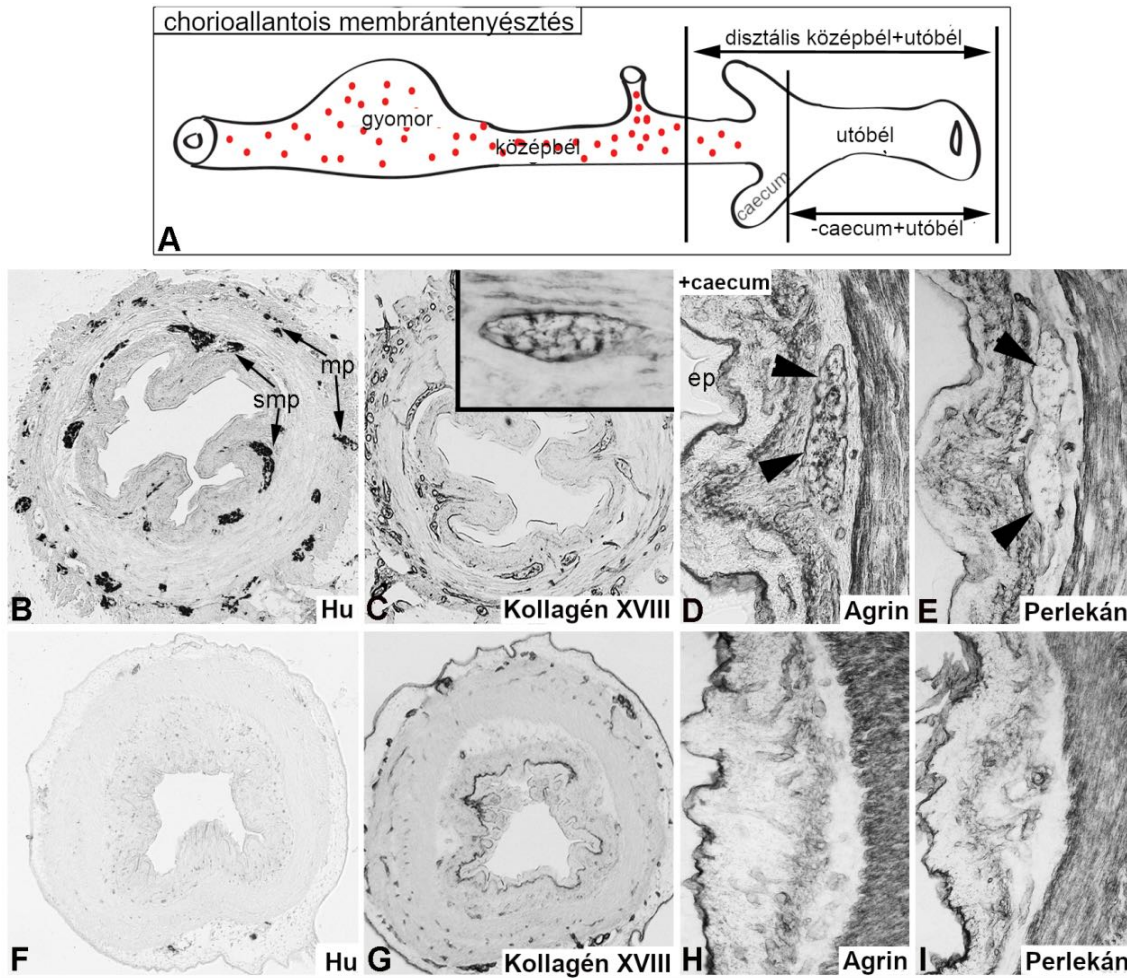


20. ábra: A legelől vándorló entericus ganglionléc-eredetű sejteket kollagén XVIII veszi körül. A legelől vándorló sejtek körül kollagén XVIII expresszió figyelhető meg, az agrin csak néhány nappal később a lemaradó sejtek környezetében jelenik meg. **(A-D)** 7 napos csirke embrióban a legelől haladó entericus ganglionléc-eredetű sejtek az utóbél középső szakaszánál járnak [(B) és (D) kép az (A), illetve (C) ábrán bekeretezett terület kinagyítva]. (B) Az elől haladó, p75+ entericus ganglionléc-eredetű sejteket kollagén XVIII veszi körül, de (D) agrin nem látható. (E) 8 napos embrióban a legelső sejtek már az utóbél disztális szakaszánál járnak, (F) körülöttük továbbra is fokozott a kollagén XVIII expresszió. (G) Agrin továbbra sem ábrázolódik. (A) A bél ganglionált szakaszán a hám alatti mesenchymában is expresszálódik kollagén XVIII (nyíl), (A) míg a ganglionmentes területén ez nem figyelhető meg (csillag). (H) 10E korban az utóbél entericus ganglionléc-eredetű sejtjei körüli kollagén XVIII expresszió megtartott [nyílhegy jelöli a kollagén XVIII+ hám bazálmembránt; (I) a bekeretezett terület kinagyítva]. (J) A 10 napos embrió utóbélének proximális szakaszán megjelenik a ganglionok körüli agrin expresszió, (K) a disztális területen továbbra sem fejeződik ki. (L) A perlekán periganglionárisan nem mutatható ki. 12E stádiumban a ganglionok területén már egyöntetűen (M) (nyíl a submucosalis ganglionokat mutatja; a bekeretezett területen ezek egyike látható kinagyítva) kollagén XVIII és (N) agrin expresszió is megfigyelhető, (O) azonban a perlekán továbbra sem fejeződik ki. *Ep*, epithelium; *NoR*, Remak ideg

5.10. A kollagén XVIII és az agrin expressziójához elengedhetetlen a ganglionléc-eredetű sejtek jelenléte

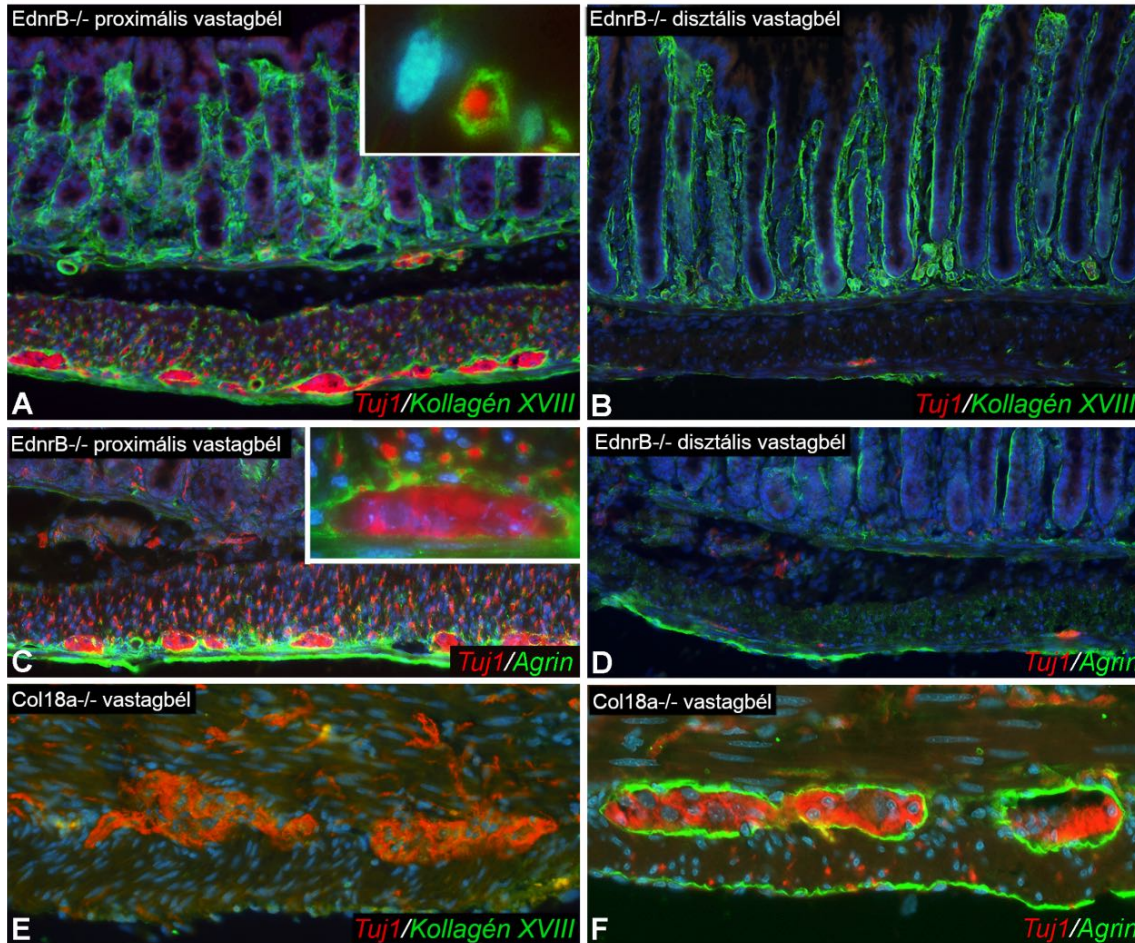
A kollagén XVIII és az agrin molekulák ganglionléc-eredetű sejtekhez köthető expressziója felveti a kérdést, hogy az entericus ganglionléc-eredetű sejtek szükségesek-e a HSPG fehérjék expressziójához. Ennek eldöntésére kísérletesen és genetikailag aganglionotikus modelleket alkalmaztunk. Elsőként 5 napos embrióból származó, középbél, caecum és kloáka abláción átesett, ganglionmentes csirke utóbelet 9 napos fogadó embrió chorioallantois membránján tenyésztettünk. A transzplantált utóbelek ganglionmentesek maradtak, míg a kontroll explantátumokban, ahol ganglionléc-eredetű sejteket tartalmazó középbél és caecum telepét az utóbéllel együtt transzplantáltuk, a sejtek folytatták vándorlásukat és normál bélidegrendszer alakult ki (21. ábra A). A ganglionokat tartalmazó kontroll explantátumokban Hu⁺ entericus neuronok hálózata mutatható ki (21. ábra B), ami körül jellegzetes HSPG expresszió látható (21. ábra C-E). A Hu⁺ sejtektől mentes, aganglionotikus bélszakaszokban (21. ábra F) a kollagén XVIII és agrin expresszió is jelentősen megváltozott. A kísérletes ganglionmentes bélszakaszban a plexus neuralisoknak megfelelő helyen mindkét HSPG fehérje expressziója hiányzott (21. ábra G, H). Ezzel szemben a nagyobb erek és a felszíni hám bazális membránja továbbra is expresszálja a kollagén XVIII-at, illetve a simaizom, a hám, valamint az erek agrin termelése is folytatódik. A perlekán expressziójában változás nem volt megfigyelhető (21. ábra I).

Hirschsprung-kór modellállatként használt Ednr^{b-/-} null mutáns egerekből izoláltuk a ganglionmentes disztális vastagbél szakaszt. A vastagbél proximális, ganglionokat tartalmazó szakaszának plexusai körül kifejezett kollagén XVIII és agrin expressziót lehet megfigyelni (22. ábra A, C), azonban a disztális, ganglionmentes szakaszon a bélfalból mindkét HSPG mesenchymalis expressziója hiányzik (22. ábra B, D). A csirke embrióból és az egérből származó adatok egybehangzóan arra utalnak, hogy az entericus ganglionléc-eredetű sejtek jelenléte szükséges a kollagén XVIII és az agrin periganglionáris expressziójához.



21. ábra: A periganglionáris kollagén XVIII és agrin expresszióhoz szükségesek az entericus ganglionléc-eredetű sejtek. (A) 5 napos csirke embrió utóbélét caecummal együtt vagy a nélkül fogadó csirke embrió chorioallantois membránjára transzplantáltuk. 9 nap elteltével a közép és utóbél tartalmazó explantátum vastagbélnek területén (B) Hu+ entericus neuronokat tartalmazó ganglionok, valamint normál (C) kollagén XVIII (a bekeretezett részben kollagén XVIII-at expresszáló ganglion látható), (D) agrin és (E) perlekán expresszió figyelhető meg. [(D) és (E) ábrán a nyílhegyek submucosalis ganglionokra mutatnak] A caecum nélkül transzplantált (aganglionotikus) bélszakaszban (F) az entericus neuronok hiánya, (G) rendellenes kollagén XVIII és (H) rendellenes agrin expresszió továbbá (I) megtartott perlekán expresszió látszik. *Ep*, epithelium; *mp*, myentericus plexus; *smp*, submucosalis plexus

Ezek után felvetődik a kérdés, hogy vajon ez fordítva is fennáll-e, azaz a HSPG-ek szükségesek-e a bélidegrendszer kialakulásához? Ezt $Col18a^{-/-}$ null mutáns egér vastagbélének vizsgálatával próbáltuk megválaszolni. Annak ellenére, hogy a $Col18a^{-/-}$ null mutáns egér vastagbélében kollagén XVIII expressziót nem láttunk, a bélidegrendszer kialakulása nem szenvedett zavart (22. ábra E). Az agrin expressziója nem mutatott különbséget (22. ábra F).

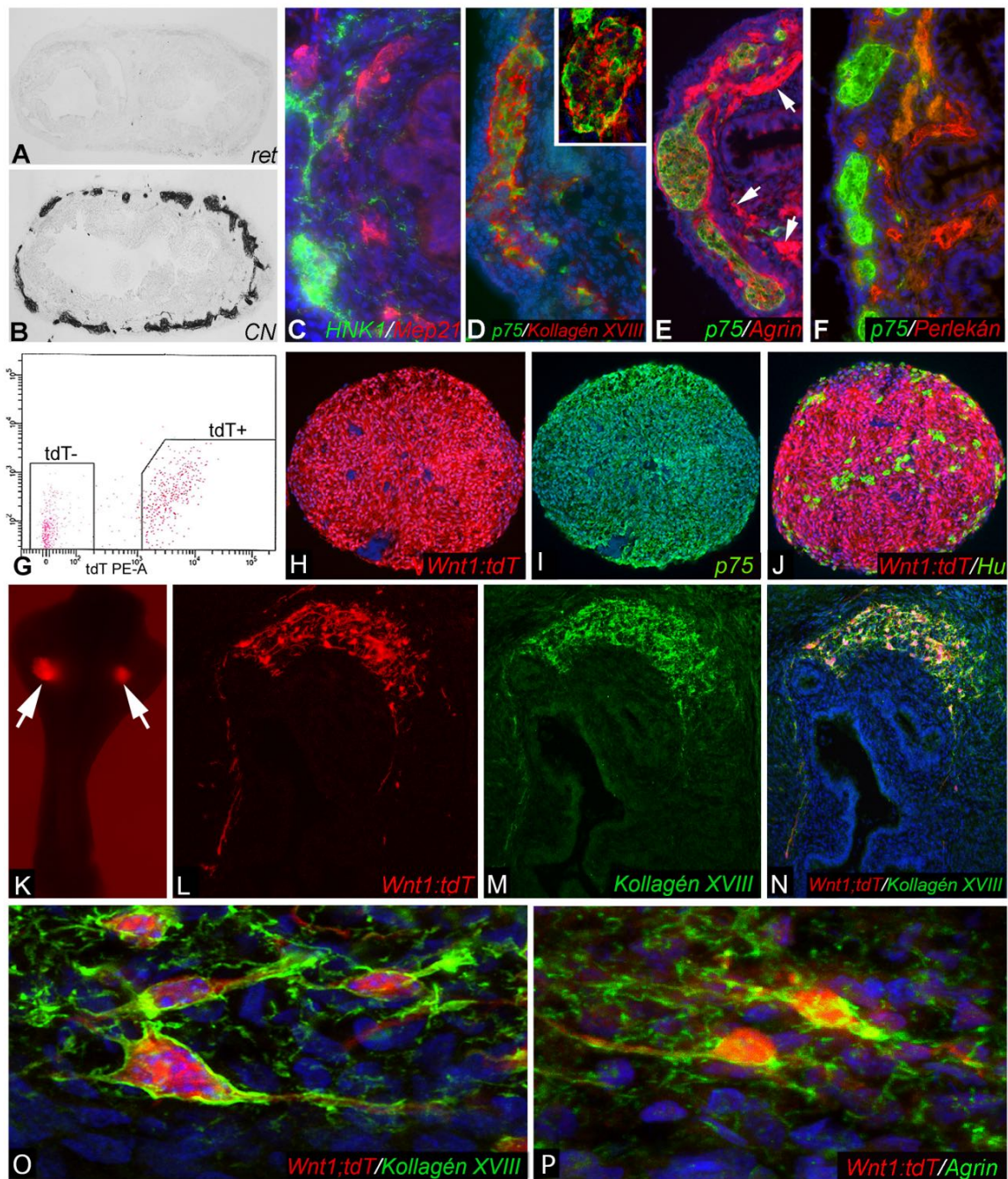


22. ábra: Az *EdnrB*^{-/-} egér vastagbélében hiányzik a kollagén XVIII és az agrin expresszió. (A) A 3 hetes *EdnrB*^{-/-} egér vastagbélének proximális, ganglionokat még tartalmazó területén a Tuj1⁺ entericus ganglionok és azok rostjai körül jellegzetes kollagén XVIII expresszió figyelhető meg (a kinagyított képen Tuj1⁺ rost látható), míg (B) a vastagbél disztális, aganglionotikus területén hiányoznak a Tuj1⁺ sejtek és a muscularis rétegben nincs kollagén XVIII expresszió. (C) A vastagbél proximális (ganglionokat tartalmazó) szakaszának ganglionjai körül agrin expresszió ugyancsak megfigyelhető, amely azonban a neuronális rostok körül nem ábrázolódik. (D) Az aganglionotikus bélfalban nem látni periganglionáris agrin expressziót. A 6 hetes, kollagén XVIIIa hiányos egér normál (E) Tuj1 és (F) agrin expressziós mintázatot mutat.

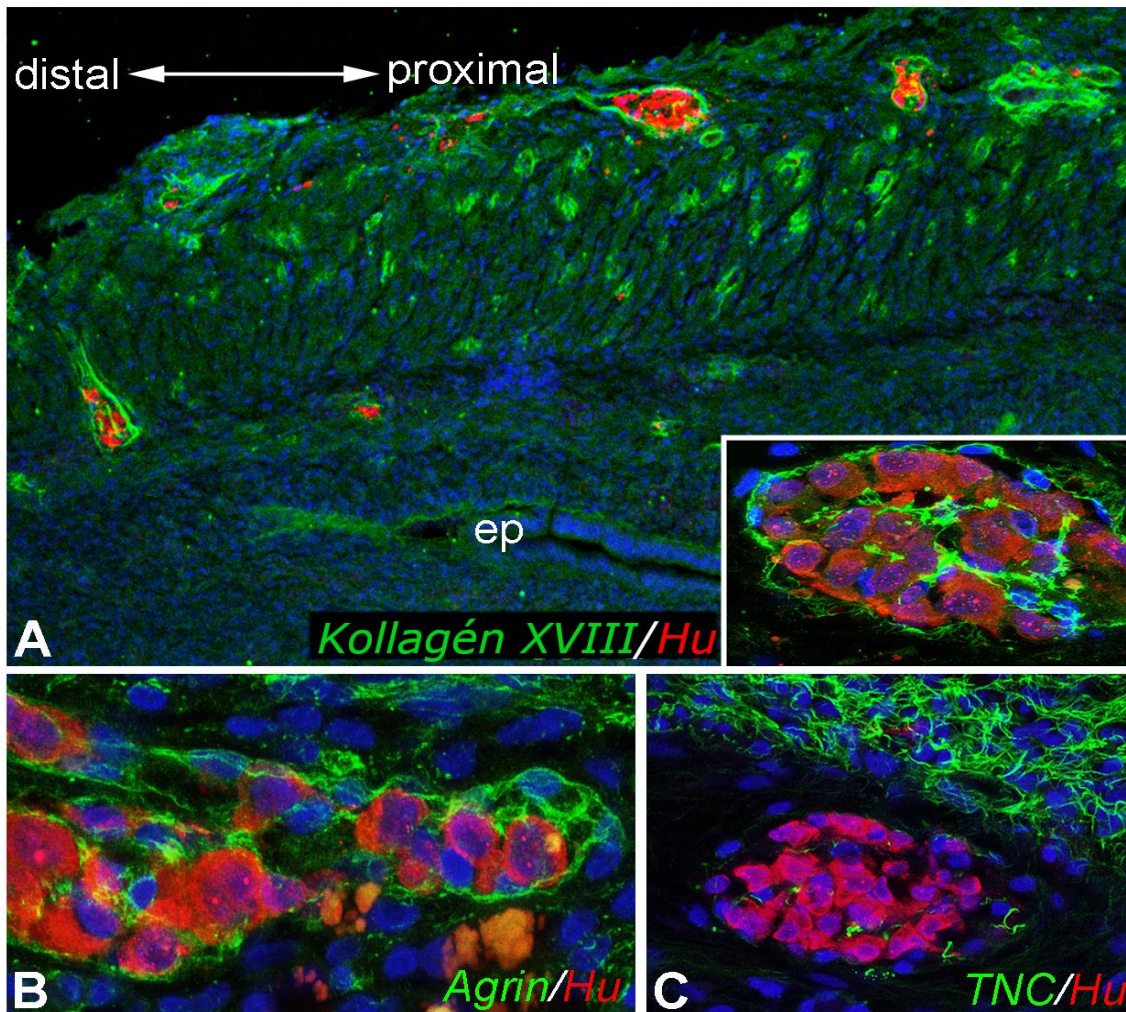
5.11. A ganglionokhoz asszociált kollagén XVIII-at és agrint az entericus ganglionléc-eredetű sejtek termelik

A chorioallantois membrántenyészetekből és a transzgenikus embriókból nyert *in vivo* eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy az agrint és kollagén XVIII-at a ganglionléc sejtek termelik. Ennek megválaszolására olyan csirke-egér kimérákat készítettünk, ahol 11,5 napos egér preganglionotikus utóbél szakaszát 3 napos fogadó csirke embrió testüregébe transzplantáltuk (Nagy és Goldstein 2006b). Korábbi munkánk szerint a transzplantált fűrj, egér vagy patkány embriókból származó preganglionotikus bélszakaszokat a fogadó csirke embrióból származó vagus-eredetű

ganglionléc sejtek teljesen benépesítik és submucosalis valamint myentericus plexusokat hoznak létre (Nagy és Goldstein 2006b, Akbareian és mtsai 2013). A transzplantált egér utóbeleket 9 nap inkubálás után izoláltuk a fogadó csirke embriók testüregéből. A kimérizmust ellenanyagokkal igazoltuk. Anti-Ret ellenanyag csak az egér ganglionléc-eredetű sejteken expresszálódik (23. ábra A), a CN pedig kizárólag a csirke eredetű neuronokban és neurális prekursorokban fejeződik ki (23. ábra B). A graftokból készült sorozatmetszetek immunfestése minden esetben azt mutatta, hogy a bélidegrendszer kizárólag csirke eredetű sejtekből származik. A HNK-1 csirke specifikus ganglionléc marker immunfluoreszcens jelölése alátámasztja, hogy csirke eredetű ganglionléc sejtek kolonizálják a testüregbe transzplantált egér utóbelet. A ganglionléc sejtek mellett csirke embrióból származó erek vaszkularizálják a graftokat, melyek kimutatására Mep21 (csirke specifikus endothel marker) immunfestést alkalmaztunk. Az ECM fehérjék eredetét szintén fajspecifikus ellenanyaggal igazoltuk. A kereskedeleméből származó csirke specifikus anti-kollagén XVIII, anti-agrin és anti-perlekán ellenanyagokat mi is leteszteltük egér szöveteken, de specifikus keresztreakciót nem láttunk. Anti-csirke kollagén XVIII (23. ábra D), anti-csirke agrin (23. ábra E), anti-csirke perlekán (23. ábra F) és a ganglionléc sejtekre specifikus p75 kettős immunfluoreszcens festése azt mutatja, hogy a testüregbe ültetett egér bélben a csirke-kollagén XVIII és csirke-agrin típusú ECM a fejlődő enterális plexusok körül és intraganglionárisan jelenik meg. A bélidegrendszeren kívül az agrin az erek bazális membránját is kirajzolja. Ehhez hasonló a perlekán expressziója, ami viszont hiányzik a differenciálódó csirke eredetű enterális ganglionok környezetéből. A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a sacralis eredetű ganglionléc sejtek ugyanúgy képesek-e kollagén XVIII-at és agrint termelni. A kísérlet során 5 napos csirke embrió, aneurális utóbelét caecum nélkül, kloákával együtt, fogadó csirke embrió chorioallantois membránjára transzplantáltuk. Ennek eredményeként kizárólag a sacralis eredetű ganglionléc sejtek kolonizálták az utóbelet (Nagy és mtsai 2007). Immuncitokémiai analízis szerint a chorioallantois membrán graftokban fejlődő sacralis eredetű ganglionok kollagén XVIII-at (24. ábra A) és agrint (24. ábra B) is expresszáltak. Kontrollnak anti-tenascint használtunk, amiről korábban már igazoltuk, hogy csak a vagus eredetű sejtek termelik (24. ábra C) (Akbareian és mtsai 2013).



23. ábra: Az entericus ganglionléc-eredetű sejtek kollagén XVIII-at és agrint termelnek. 11.5 napos vad típusú egér aneurális utóbelét 3 napos csirke embrió testüregébe transzplantáltuk. 9 nap elteltével a transzplantált bélszakasz (A) egér specifikus Ret ellenanyaggal nem festődik, (B) a megjelenő neuronok csirke specifikus CN pozitivitása alátámasztja a graft bélidegrendszerének csirke eredetét. (C-F) A sorozatmetszeteken csirke eredetű ganglionléc sejtek és (C) szintén a fogadó embrióból származó MEP21+ endothelsejtek láthatóak. A (D) kollagén XVIII, (E) az agrin és (F) a perlekán csirke specifikus ellenanyag festődése az egér grafiban megjelenő HSPG-ok madár eredetét igazolja. A (D) ábrán kinagyítva egy myentericus ganglion látható. (E) Nyilak a fogadó embrióból származó erek által expresszált agrin fehérjét jelölik. (G) 3 hetes Wnt1;tdT egér béltraktusából FACS-sorter segítségével generált (H) Wnt1+, (I) p75+ és (J) Hu+ sejteket tartalmazó idegi sejttaggregátumokkal is megpróbáltuk alátámasztani eddigi megfigyeléseinket. Az idegi sejttaggregátumokat 5 napos csirke embrió (K) caecumába ültetettük (nyilak), melyet ezt követően 9 napig chorioallantois membránon tenyésztettünk. (L-N) A tenyésztés ideje alatt a Wnt1+ sejtek a bélfal mentén vándoroltak és egér eredetű kollagén XVIII-at termeltek. A Wnt1+ sejtek egér specifikus (O) anti kollagén XVIII és (P) anti-agrin festődése az ECM fehérjék entericus ganglionléc-eredetű sejt eredetét igazolja.

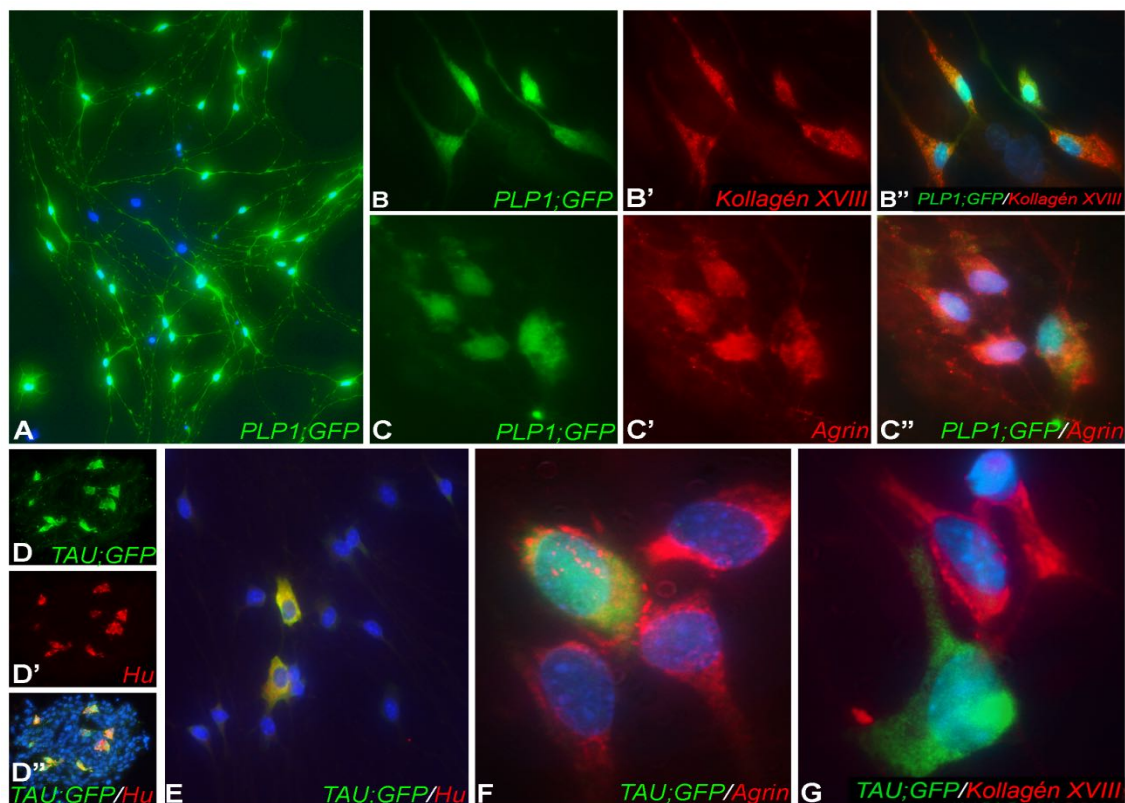


24. ábra: A sacralis ganglionléc-eredetű sejtek is expresszálják a kollagén XVIII-at és az agrint. 5 napos csirke caecum nélküli, de kloákát tartalmazó utóbelét fogadó embrió chorioallantois membránjára transzplantáltuk, a tenyésztett bélszakaszt csak sacralis eredetű entericus ganglionléc-eredetű sejtek kolonizálták. A kialakult bélidegrendszer néhány (A) kollagén XVIII-at és (B) agrint is expresszáló Hu⁺ entericus gangliont tartalmaz, (C) amelyek tenaszcin-C-t nem termelnek. *Ep. epithelium*

Ganglionléc-eredetű sejtek ECM termelését célzó csirke embriómanipulációs kísérletek után arra voltunk kíváncsiak, hogy a posztnatális egerből izolált entericus ganglionléc-eredetű őssejtek is megtartják-e a kollagén XVIII és agrin expressziójukat? Ezekhez a kísérletekhez Dr. Ryo Hotta (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School Boston) szíveségéből rendelkezésünkre bocsájtott 3 hetes Wnt1;tdT egér béltraktusából előállított idegi sejtaggregátumokat (neurosphere) használtunk. Az idegi sejtaggregátumok előzetes vizsgálata igazolta, hogy a sejteket diffúz Wnt1 (23. ábra H) és p75 expresszió jellemzi (23. ábra I), továbbá néhány Hu⁺ entericus neuron is kimutatható (23. ábra J). A kísérlet során az idegi sejtaggregátumokat 5 napos csirke embrió caecalis régiójába ültettük (23. ábra K) és a rekombinált szövetet 9 napos fogadó

embrió chorioallantois membránján tenyésztettük. A graftokat 9 nap elteltével egér specifikus kollagén XVIII és agrin ellenanyagokkal jelöltük. A Wnt1+ sejtek bél falon belüli vándorlása (23. ábra L), valamint a sejtek és a kollagén XVIII koexpressziója is szépen kirajzolódik (23. ábra M, N). Nagy felbontású konfokális képek azt igazolják, hogy csakúgy, mint csirke embrióban az egér eredetű entericus neuronális őssejtek is kollagén XVIII-at (23. ábra O) és agrint (23. ábra P) termelnek.

Annak meghatározására, hogy a posztnatális bélben később melyik bélidegrendszeri sejtípus képes HSPG-okat termelni Plp1^{GFP} (minden entericus glia zöld pozitivitást mutat) és Tau^{GFP/+} (minden entericus neuron zöld pozitivitást mutat) transzgenikus egerek vékony és vastagbél bélidegrendszeréből létrehozott fluoreszcensen jelölt idegi sejttaggregátumokat tenyésztettünk. A disszociáltatott idegi sejttaggregátumokból fibronektinnel borított felszínen 4 nap alatt komplex neuron és glia hálózat fejlődött ki. Kettős immunfluoreszcens festések szerint a PLP1+ gliasejtek kollagén XVIII-at és agrint is expresszálnak (25. ábra A-C''), míg a Tau+ entericus neuronok csak agrint termelnek (25. ábra D-G).



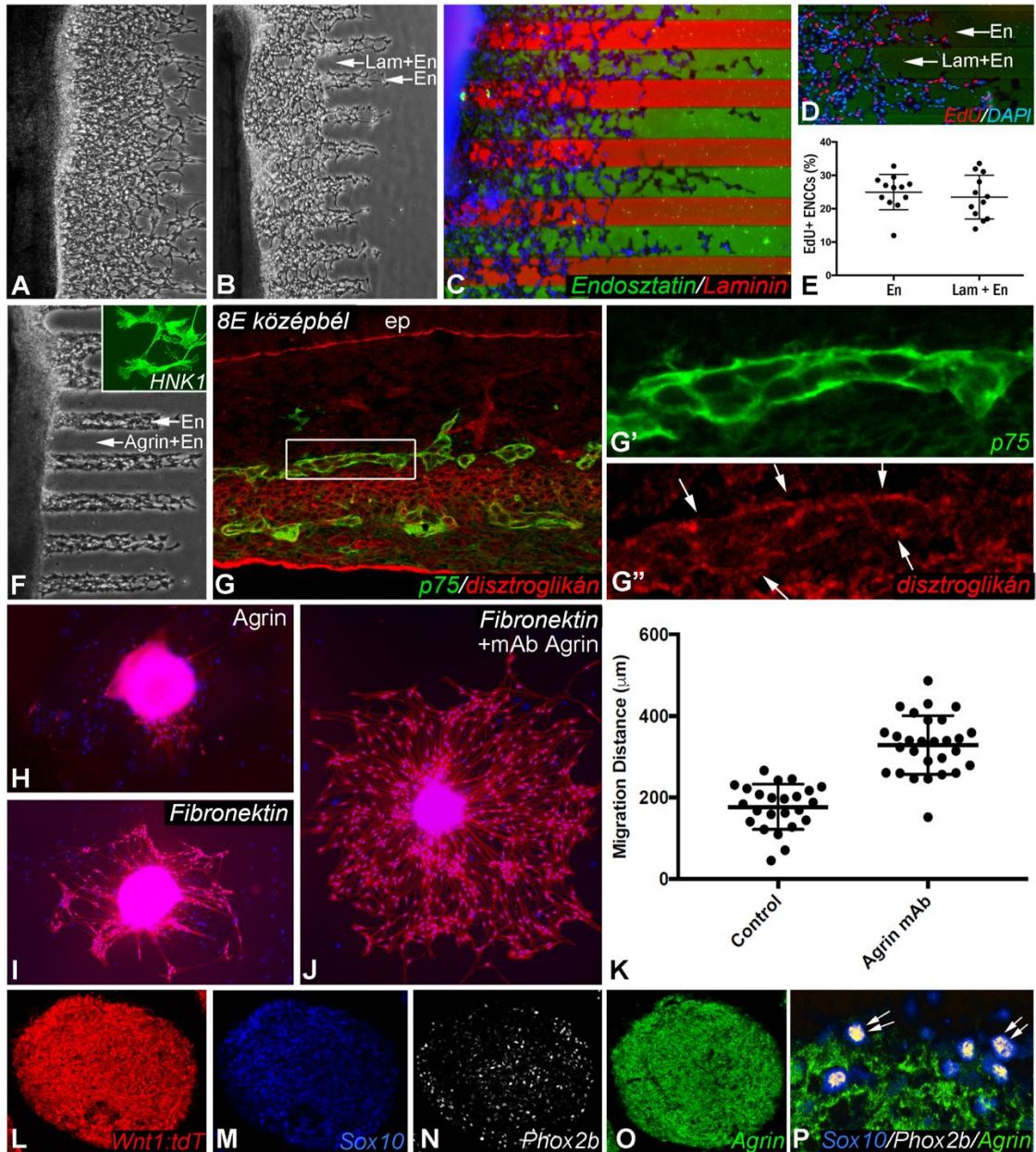
25. ábra: Az entericus glia kollagén XVIII-at és agrint is expresszál. (A) Posztnatális Plp1^{GFP} egérből generált entericus idegi sejttaggregátumokat disszociáltattuk, majd 4 napig tenyésztettük. Az entericus glia (B-B'') kollagén XVIII-al és (C-C'') agrinnal is koexpresszál. A Tau^{GFP/+} egérből előállított idegi sejttaggregátumokban (D-D'') Tau+/Hu+ entericus neuronok láthatóak. (E) A disszociáltatott idegi sejttaggregátumok Tau+/Hu+ entericus neuronjai (F) agrint expresszálnak, de (G) kollagén XVIII-at nem.

5.12. Az agrin és a kollagén XVIII hatása az entericus ganglionléc-eredetű sejtek vándorlására

A két HSPG expressziós mintázatának meghatározása után a következő feladatunk a funkció meghatározása volt. Az agrin és kollagén XVIII ganglionléc sejtekre kifejtett hatását *in vitro* sejt migrációs (stripe-choice assay) analízissel hasonlítottuk össze. Kísérleteinkben 7 napos csirke embrióból izolált középbelet 24 órán keresztül, 10 ng/ml GDNF jelenlétében egy olyan felszínen tenyésztettük, melyre előzetesen váltakozó sávokban különböző ECM fehérjéket vittünk fel. A kollagén XVIII-at rekombináns endosztattinnal kellett helyettesítenünk, mivel a fehérje tisztított formája a kereskedelemben nem elérhető. A tenyésztett ganglionléc-eredetű sejtek egyaránt jól vándoroltak az endosztattinnal (50 µg/ml), valamint az endosztattinnal és az entericus ganglionléc-eredetű sejtek számára permisszív hatású fibronektinnel (20 µg/ml), illetve lamininnel (10 µg/ml) együtt bevont sávokon (26. ábra A). Érdekes, hogy kizárólag endosztatin felületű sávokon a sejtek messzebbre vándoroltak, mint az endosztatin és laminin is tartalmazó területeken (26. ábra B, C). A laminin és endosztatin specifikus immunfestés igazolja és kirajzolja a sávok molekuláris tulajdonságait (26. ábra C). Az EdU alapú proliferációs teszt nem mutatott szignifikáns különbséget az endosztatin vagy laminin felszínen vándorló sejtek proliferációjában (26. ábra D). A sejt vándorlást megengedő endosztattinnal szemben az agrin gátló hatással bír, ugyanis míg az endosztatin felszínen a ganglionléc eredetű sejtek jól vándoroltak, addig az agrin és endosztatin együttes jelenlétében megálltak (26. ábra F). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a gátló hatás közvetlenül a sejteken érvényesül, ezért a következőkben az ismert agrin receptorok jelenlétét vizsgáltuk meg (Winder 2001, Zong és Jin 2013). Az agrin molekulának 2 sejt felszíni receptora ismert: MUSK és disztroglikán. A MUSK receptor az intesztinális simaizom sejteken kifejeződik, de az entericus ganglionokon nem található meg. A disztroglikán expresszióját a simaizom és epithel sejtek mellett az entericus ganglionléc-eredetű sejteken is sikerült azonosítani (26. ábra G-G”).

Amikor a Wnt1;tdT egérből származó idegi sejtaggregátumokat agrinnal bevont felszínen tenyésztettük, az embrionális sejtekhez hasonlóan a posztnatális idegi sejtaggregátumokból sem tapasztaltuk az entericus ganglionléc-eredetű sejtek kivándorlását (26. ábra H). Ezzel szemben a fibronektin felszínen kifejezett vándorlást láttunk (26. ábra I). Amennyiben pedig az idegi sejtaggregátumokat fibronektinnel bevont felületen, agrinfunkciót blokkoló antitest jelenlétében tenyésztettük, az idegi

összejtek migrációs távolsága jelentősen megnövekedett (26. ábra J). A különböző összeállításokban megfigyelhető eltéréseket, számszerűsítve is összehasonlítottuk. A kontroll esetben (az idegi sejtaggregátumokat csak fibronectin bevonaton tenyésztve) a ganglionléc-eredetű sejtek $177 \pm 55 \mu\text{m}$ -t vándoroltak, míg agrinfunkciót blokkoló antitest jelenlétében $329 \pm 72 \mu\text{m}$ -re jutottak, ami 86% növekedés jelentett (26. ábra K, $P < 0,0001$, Student's t -teszt). Ezekkel az idegi sejtaggregátumokon végzett kísérletekkel emlős sejtek esetében is igazoltuk az agrin sejtvándorlást gátló hatását. Az idegi sejtaggregátum tenyészetekből nem derül ki, hogy az agrin gátló hatása, pontosan melyik sejten érvényesül, ugyanis azt már korábban bemutattuk, hogy az embrionális bélben vándorló, még differenciálatlan progenitor sejtek agrint nem expresszálnak (20. ábra C, D). Wnt1,tdT egérből származó idegi sejtaggregátumok metszetein Sox10 és Phox2b koexpressziójuk alapján azonosítottuk a differenciálatlan, progenitor sejteket. Kimutattuk, hogy a kettősen pozitív sejtek nem expresszáltak agrint (26. ábra L-P), viszont a Phox2b+/Sox10- neuron és a Phox2b-/Sox10+ glia prekursorokat agrin expresszió jellemzi. Az agrin gátlása tehát nem a differenciálatlan progenitorok, hanem elsősorban a vándorlási potenciáljukat fenntartott, elkötelezett prekuzornak tekinthető sejtpopulációk idegi sejtaggregátumokból történő kivándorlását fokozta. Ez az eredmény egybehangzik Young és munkatársainak 2014-ben leírt munkájával miszerint a bélidegrendszerben lévő elkötelezett prekursorok migrációs kapacitással rendelkeznek (Young és mtsai 2014), amit a terminális differenciálódás előtt rövid idővel veszítenek el.



26. ábra: Az agrin gátolja az entericus ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását. 7 napos csirke embrió közepbelét 24 órán keresztül, különböző ECM fehérjéket váltakozó sávokban tartalmazó felszínen tenyésztettük. **(A)** Az entericus ganglionléc-eredetű sejtek a csak endosztattinnal, valamint az endosztattinnal és fibronektinnel együtt bevont sávokon egyaránt jól vándoroltak. **(B)** A csak endosztatin felületű sávokon a sejtek messzebbre jutottak, mint az endosztatint és laminint is tartalmazókon. **(C)** A laminin és endosztatin specifikus immunfestés kirajzolja a sávok helyzetét (zöld, endosztatin; piros, endosztatin és laminin együtt). **(D, E)** Az entericus ganglionléc-eredetű sejtek proliferációját EdU alapú teszttel mértük. **(F)** Az endosztattinnal borított sávokon az entericus ganglionléc-eredetű sejtek jól vándoroltak, míg agrin jelenlétében erre nem voltak képesek (kinagyítva vándorló HNK-1+ entericus ganglionléc-eredetű sejtek láthatóak). **(G)** Az agrin entericus ganglionléc-eredetű sejtekre kifejtett gátló hatása feltehetőleg a sejtek disztroglikán expresszióján keresztül valósul meg [(G') és (G'')] ábra a (G) bekeretezett területe kinagyítva, nyilak az entericus ganglionok disztroglikán expresszióját jelölik]. **(H)** A Wnt1;tdT-eredetű idegi sejtaggregátumok agrinnal borított felszínen történő tenyésztése során, az entericus ganglionléc-eredetű sejtek nem vándoroltak ki. **(I)** A fibronektinnel borított felszínen a sejtek jól vándoroltak, **(J-K)** agrin funkciót blokkoló antitest jelenlétében pedig még nagyobb migrációs távolság figyelhető meg. **(L-P)** A Sox10+/Phox2b+ kettősen immunpozitív sejtek agrin expressziójának hiánya igazolja, hogy a Wnt1;tdT idegi sejtaggregátumokban található entericus ganglionléc-eredetű progenitor sejtek nem termelnek agrint (nyilak). *En*, endostatin; *ep*, epithelium; *Lam*, laminin. Az **(E)** és a **(K)** grafikon közepső és szélső sávjai az átlagot, valamint az *s.d* értékeket jelölik.

6. MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt néhány évtized kutatásainak köszönhetően a bélidegrendszer fejlődéséről és működéséről egyre több adattal rendelkezünk, ugyanakkor kevés információnk van az enterális idegrendszert érintő veleszületett betegségek molekuláris hátteréről és embrionális kialakulásuk mechanizmusáról. Kísérleti munkánk során kiemelten foglalkoztunk a Hirschsprung-kórral, amit a ganglionléc-eredetű sejtek rostrocaudalis irányú migrációjának zavara következtében kialakuló disztális bélrendszeri aganglionózis jellemez. A bélidegrendszer zavartalan fejlődését a ganglionléc-eredetű sejtek migrációja, proliferációja és differenciálódása közti finom egyensúly fenntartása, valamint a vándorló sejteket körülvevő mikrokörnyezet megfelelő interakciója biztosítja (Nagy és Goldstein 2017). Mára számos, a bélidegrendszer fejlődésében és rendellenességei patomechanizmusában részt vevő molekuláris faktort sikerült azonosítani (Goldstein és mtsai 2013): a GDNF, az Endothelin-3 és a BMP-4 mesenchymalis faktorok jelátviteli folyamataiban bekövetkező genetikai elváltozások kritikus szerepet játszanak a bélidegrendszert érintő veleszületett betegségek hátterében, de a bélepitheliumból szekretált faktorok entericus ganglionléc-eredetű sejtek vándorlására és proliferációjára kifejtett hatásának szerepe is gyakran felvetődik (Sukegawa és mtsai 2000). Míg a bélhamban termelődő netrin a vándorló ganglionléc-eredetű sejtekre kemoattraktáns hatást gyakorol (Jiang és mtsai 2003), addig a Hedgehog fehérjék családjába tartozó Sonic hedgehog növekedési faktor határozza meg a bélcső radiális szimmetriáját. In vitro adatok szerint a Shh nemcsak a béltraktus mesenchymalis elemeinek differenciálódását képes befolyásolni, hanem sejtproliferációt gátló hatása révén az entericus ganglionok méretét is szabályozhatja. A Shh jelátvitel bélidegrendszer fejlődésére gyakorolt szerepét in vivo körülmények között csak transzgenikus egér és zebrahal embriókon vizsgálták. A Hedgehog jelátvitelt érintő mutáns egerek bélidegrendszerét ektopikus ganglionok és szegmentális aganglionózis jellemzi. A Hedgehog fehérjék és a Hirschsprung-kór kapcsolatát a humán biopsziák genomikai analízise során igazolt Ptc1 receptor mutáció is alátámasztja (Ngan és mtsai 2011). A Gas1 (Hh sejt felszíni receptor) és Gnaz (intracelluláris effektor) molekula deléciója következtében a Shh null mutáns egerekhez hasonló fenotípus jön létre, azaz megnő az entericus neuron szám és ektopikus ganglionok jelennek meg (Ramalho-Santos és mtsai 2000, Biau és mtsai 2013, Jin és mtsai 2015). Ezzel szemben a Hedgehog jelátvitelben szintén szerepet játszó Gli1

overexpressziója az entericus ganglionok hiányához vezet (Yang és mtsai 1997). A bélhamban termelődő Shh (Indian hedgehog) mutáns embriók utóbelében szegmentális ganglionmentes területek alakulnak ki. Fu és munkatársai szerint, izolált egér vastagbél tenyészetében a Shh gátolja a ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását és differenciálódását (Fu és mtsai 2004). A bélidegrendszer-eredetű sejtaggregátum tenyészetében (neurosphere technika) a Shh serkentette a neurális sejtek proliferációját, ami ellentmond a Shh mutáns egerek bélidegrendszerében megfigyelt proliferációnak. Ezt támogatja Reichenbach és munkatársai zebrahal embrión végzett kísérlete, ami szerint a Shh jelátvitelt gátló cyclopamine kezelés a ganglionléc-eredetű sejtek proliferációjának gátlásával intesztinális aganglionózishoz vezetett (Reichenbach és mtsai 2008). Az in vivo és in vitro kísérletek ellentmondásos eredményei a Shh mediált jelátvitel komplex szabályozását sugallja.

Munkánk során a Shh bélidegrendszer fejlődésére gyakorolt hatásának vizsgálatához kísérleti modellként madár embriót használtuk. A madár embrió könnyű hozzáférhetősége és manipulálhatósága miatt lehetővé teszi a különböző korban izolált bélszakaszok szervtenyésztését, a chorioallantoismembrán transzplantációt, az embrionális kimérák előállítását és a retrovírus-mediált génexpressziót. Kísérleteink kezdetén sikerült egy olyan p75 (neurotrofin receptor) specifikus poliklonális ellenanyagot azonosítani, amely a korábban alkalmazott ellenanyagokkal szemben sokkal alkalmasabb a madár ganglionléc-eredetű sejteinek jelölésére, jelentősen megkönnyítve ezzel a sejtek vándorlása szempontjából kritikus stádiumok immuncitokémiai karakterizálását. Csirke embrióból készített szervtenyészetekben a Shh az entericus ganglionléc-eredetű sejtek proliferációjának csökkenését és korai neuronális irányú differenciálódását indukálta, ami aganglionózis kialakulását eredményezte. Továbbá, a Shh retrovírus-mediálta funkciónyerés in vivo disztális aganglionózist, valamint a vastagbél proximális területének hipoganglionózist váltotta ki csirke embrióban. Ezen eredményeink alátámasztják az egér tenyészetekben megfigyelt rendellenes sejt vándorlást és aganglionózist (Fu és mtsai 2004), de ellentmondanak a sejtproliferációs adatoknak. A különbség abból adódhat, hogy Fu és munkatársai izolált idegi sejtaggregátumok proliferációját vizsgálták, mi pedig a szöveti környezetben fejlődő ganglionléc-eredetű sejtek proliferációját analizáltuk. Amikor a Hedgehog jelátvitelt gátló cyclopamine hatását követtük nyomon (szervtenyészet, chorioallantois membrán graft), minden esetben intenzív bélidegrendszer proliferációt

és hiperganglionózist figyeltünk meg. A különböző kísérleti modell embriókban kapott eltérő eredmények szükségessé tették a Hedgehog fehérjék receptorainak (Ptc1 és Ptc2) expressziós mintázatának meghatározását. Zebrahalban a vándorló Phox2b-t expresszáló ganglionléc-eredetű sejteken leírták a Ptc1 receptor kifejeződését sőt azt is igazolták, hogy migrációjukhoz a Shh jelenléte szükséges (Reichenbach és mtsai 2008). Egér embriók esetében azonban megosztóak az eredmények, Fu és munkatársai, valamint Ngan és munkatársai vizsgálata alapján az emlősök ganglionléc-eredetű sejteinek felszínén immuncitokémiával kimutatható a Shh receptor (Ptc1), míg a transzgenikus egérembrióban végzett expressziós mintázatok ennek ellenkezőjét állítják (Smoak és mtsai 2005, Kolterud és mtsai 2009). Saját kísérleteink során nem láttunk eltérést a két faj Ptc1 receptor expressziójában: a madár embrió béltraktusának mesenchymájában mindkét Shh receptor jelenléte kimutatható, azonban a Ptc1 in situ hibridizáció és a p75/HNK-1 immuncitokémia együttes alkalmazása nem igazolta a ganglionléc sejteken feltételezett koexpressziót. Az egér embrionális utóbelének Ptc1 expressziós mintázatában is ugyanezt figyeltük meg. A Shh receptorok expressziójának entericus ganglionléc-eredetű sejten megfigyelhető hiánya felveti annak a lehetőségét, hogy az Shh gátló hatása nem a bélidegrendszer sejtein közvetlenül, hanem az entericus ganglionléc-eredetű sejteket fogadó mikrokörnyezet módosításán keresztül érvényesül. A Shh ezen indirekt hatását igazolandó megvizsgáltuk, hogyan hat a Shh a mesenchymalis környezettől izolált ganglionléc-eredetű sejtek vándorlására. A kísérlet kezdetén a mesenchymában termelődő kemoattraktáns GDNF molekula jelenlétében a ganglionléc-eredetű sejtek a bélből a fibronektinnel borított felszínre vándoroltak. A Shh-ot a tenyésztés kezdetét követő 24 óra elteltével adtuk a GDNF-et már tartalmazó tenyészethez. Ebben az esetben az entericus ganglionléc-eredetű sejtek a gátló hatású Shh növekedési faktor jelenléte ellenére is folytatták periféria irányába történő vándorlásukat. Eredményeink azt sugallják, hogy a Shh direkt úton nem gátolja az entericus ganglionléc-eredetű sejtek migrációját és a sejteket befogadó mikrokörnyezet módosításán keresztül fejt ki hatását. Ennek a felvetésnek az alátámasztására ex vivo és in ovo modellekben tanulmányoztuk a Shh overexpresszió ECM-ra kifejtett hatását. Olyan fehérjék változását vizsgáltuk, melyek a ganglionléc-eredetű sejtek vándorlásának ismert szabályozói (Payette és mtsai 1988, Newgreen és Hartley 1995, Nagy és mtsai 2009). A laminin (Nagy és mtsai 2009), a fibronektin (Akbareian és mtsai 2013), a kollagén I (Young és Newgreen 2001, Nagy és Goldstein 2006a, Chevalier és mtsai 2016) és a tenaszcin (Akbareian és mtsai 2013) serkenti, a kollagén

VI (Soret és mtsai 2015), valamint a CSPG-ok családjába tartozó verszikán és kollagén IX pedig gátolja a ganglionléc sejtek migrációját (Newgreen és Thiery 1980, Bronner-Fraser 1986, Oakley és mtsai 1994, Perris és mtsai 1996, Dutt és mtsai 2006). Korábban már Kapur és munkatársai is megállapították, hogy a mesenchymát érintő elváltozások befolyásolják a sejtek migrációját (Kapur és mtsai 1995). Vaos kutatásai szerint bármely eltérés, mely a fejlődő bél mikrokörnyezetét érinti a myentericus plexus veleszületett rendellenességeit okozhatja (Vaos 1989, Holschneider és mtsai 2005). Egy 2003-ban publikált csirke embrión végzett kísérletben, a ganglion trigeminale neuronjait létrehozó cranialis ganglionléc-eredetű sejtek vándorlása ektopikus Shh hatására elmaradt, amivel párhuzamosan a környező mesenchymában fokozódott a verszikán expresszió (Fedtsova és mtsai 2003). Később mások azt is kimutatták, hogy a fibronektinnel bevont felszínen tenyésztett, velőcsőből kivándorló ganglionléc-eredetű sejtek migrációját a verszikán képes teljesen megakadályozni (Dutt és mtsai 2006, Szabó és mtsai 2016). Saját eredményeink szintén felvetik annak a lehetőségét, hogy az in vitro és az in ovo tenyésztett bélszakaszokban megfigyelt Shh overexpresszióhoz köthető aganglionózist a gátló hatású mátrixfehérjék felszaporodása okozza. A gátló hatású CSPG-ok immuncitokémiai festésével jelentős változásokat figyeltünk meg. Normál esetben a verszikán és a kollagén IX expressziója az embrionális bélcső belső, leendő submucosalis mesenchymájának területére korlátozódik, míg a Shh kezelés hatására expressziójuk jelentősen megemelkedett és a bélfal teljes szélességére kiterjedt. A Shh jelátvitel gátlása ugyanakkor ezen CSPG-ok expresszióját drasztikusan lecsökkentette. Megfigyeltük, hogy a Shh az ECM mintázatának megváltoztatásán túl befolyásolja a GDNF mesenchymalis expresszióját is. Shh hatására a GDNF faktor expressziós szintje lecsökken, melynek folytán kevésbé serkenti az entericus ganglionléc-eredetű sejtek proliferációját, ezen felül kemoattraktáns hatása is gyengébben érvényesül (Young és Newgreen 2001, Nagy és Goldstein 2006a, Nagy és Goldstein 2006b, Mwizerwa és mtsai 2011). A GDNF teljes hiányában aganglionózis alakul ki (Moore és mtsai 1996, Mwizerwa és mtsai 2011). Ennek alapján a GDNF downregulációja egy másik hatásmechanizmust jelenthet, amin keresztül a Shh indirekt befolyásolja a bélidegrendszer fejlődését. Fontos megjegyezni, hogy a tenyésztéshez exogén hozzáadott GDNF hatására a mesenchyma verszikán expressziója nem változik meg. Ez alapján az valószínűsíthető, hogy a hatásmechanizmus iránya fordított, azaz a Shh először az ECM mintázatát változtatja meg és a GDNF expressziójának csökkenése csak másodlagosan következik be. Eredményeink más kutatócsoportokéval

egybehangzóan igazolni látszanak, hogy a bélfalban haladó entericus ganglionléc-eredetű sejtek migrációja nagy mértékben függ a vándorló sejt és az azt körülvevő ECM kölcsönhatásától (Nagy és Goldstein 2017).

Az epithelialis és a mesenchymalis eredetű faktorok szerepének részletesebb megismerésén túl a CSPG-ok entericus ganglionléc-eredetű sejtekkel alkotott kapcsolatába is betekintést nyertünk, ami előrevetítette a mikrokörnyezet szerepének fontosságát. A kollagénekből, proteoglikánokból és glikoproteinekből álló háromdimenziós ECM struktúra elemei az entericus ganglionléc-eredetű sejtek felszínén található receptorokkal lépnek kölcsönhatásba, melyen keresztül a mikrokörnyezet képes befolyásolni az entericus ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását, proliferációját, differenciálódását, ganglionokba rendeződését és összességében a fejlődő bélidegrendszer mintázatának kialakulását. Az ECM kiemelt szerepére számos korábbi tanulmány is utalt. Nagy és munkatársai az entericus ganglionléc-eredetű sejtek felszínén lévő $\beta 1$ -integrin receptor expressziójának jelentőségét emelték ki (Nagy és mtsai 2009), melynek hiánya a sejtek migrációs és aggregációs zavarán keresztül disztális aganglionózishoz vezet (Breau és mtsai 2006, Breau és mtsai 2009). A migrációt befolyásolni képes ECM fehérjék tehát a rostrocaudalis irányú mintázatot és a radiális szimmetria kialakulását is szabályozzák (Nagy és mtsai 2009). Az elmúlt néhány év során egyre inkább megalapozottnak tűnik, hogy ez a szabályozás nem csupán az ECM felől jövő egyirányú impulzus, hanem egy kölcsönös oda-vissza ható folyamat. Az entericus ganglionléc-eredetű sejtek nem pusztán válaszolnak környezetükre, hanem aktívan modulálják is azt. Ismert például, hogy a vándorló ganglionléc-eredetű sejtek tenascin C-t (Akbareian és mtsai 2013) és mátrix metalloproteázokat (Anderson 2010) is termelnek.

Kísérleti munkánk második részében részletesebben igyekeztünk karakterizálni a vándorló entericus ganglionléc-eredetű sejtek és az extracelluláris mikrokörnyezet közötti kölcsönhatást. A különböző fejlődési stádiumok ECM mintázatának immunhisztokémia összehasonlítása közben a HSPG-ok jellegzetes expresszióját figyeltük meg. Az agrin a bazális membránok mellett jelen van a fejlődő agy területén, illetve kimutatható a csirke érző ganglionjaiban is (Halfter és mtsai 1997, McCarthy 2015). Halfter és munkatársai leírták az éretlen Schwann sejtek által termelt agrin gátló hatását: *in vitro* tenyészetekben az agrin fehérje akadályozta a retinális neuritnövekedést (Halfter és mtsai 1997). A másik periganglionárisan megjelenő HSPG a kollagén XVIII,

az első olyan kollagén, amiről bebizonyosodott, hogy heparán-szulfát oldallánccal rendelkezik (Halfter és mtsai 1998). Az agrinhoz hasonlóan szinte az összes epithelialis és endothelialis bazális membránban megtalálható és több tanulmány szerint a ganglionléc és az idegi fejlődés szabályozásában is részt vesz (Su és mtsai 2012, Banerjee és mtsai 2013). Kimutattuk, hogy míg a kollagén XVIII már a vándorlás során legelől haladó entericus ganglionléc-eredetű sejtek környezetében is megjelenik, addig az embrionális utóbél ganglionjai körüli agrin expresszió csak a bélidegrendszer fejlődésének egy későbbi szakaszában, 48 órával a kolonizáció befejeztét követően (10. embrionális nap) azonosítható először. A kollagén XVIII fejlődő bélidegrendszerben megjelenő expresszióját a korábban bemutatott, korai egér embrióból származó entericus ganglionléc-eredetű sejtek RNS szekvenálásával nyert adatsor is megerősíti (Lasrado és mtsai 2017). Lasrado és munkatársai vizsgálatai azt mutatták, hogy a kollagén XVIII génexpresszió a differenciálatlan entericus ganglionléc-eredetű progenitorok megjelenésével egyidőben kezd kifejeződni. Munkánk során in vitro vizsgáltuk a két HSPG fehérje funkcióját. Kísérleteink alapján az agrin gátló hatással bír a vándorló entericus ganglionléc-eredetű sejtekre, így feltételezhető, hogy a végső helyzetüket már elérte, differenciálódó, neuron vagy glia irányban elkötelezett sejtek további vándorlását akadályozza meg. Az ECM fehérjék a membránhoz kötött receptoraikon keresztül közvetlenül, vagy a szöveti plaszticitás megváltoztatása útján befolyásolhatják a sejtek migrációját. Az entericus ganglionok területén csak a disztroglikánt sikerült, mint agrin receptort azonosítani, míg a MuSK-receptor kizárólag a simaizomsejteken jelent meg. Ezek alapján valószínűnek tűnik, hogy az agrin bélidegrendszeri hatása a központi idegrendszerhez hasonló módon disztroglikán receptorokon keresztül érvényesül (Henry és mtsai 2001). A kollagén XVIII bár támogatja az entericus ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását, jelenléte a Col18a-/- egér fenotípusa alapján nem esszenciális, hiányát feltehetőleg más permisszív hatású ECM molekula képes kiküszöbölni. A két HSPG eltérő funkciója magyarázatul szolgálhat az expressziós mintázatukban megfigyelt időbeli eltérésére. Kísérletünk során sikerült igazolnunk, hogy a tenaszcinhoz hasonlóan (Akbareian és mtsai 2013) az agrint és a kollagén XVIII-at is maguk az entericus ganglionléc-eredetű sejtek termelik. Ez a megállapítás csirke és egér esetében egyaránt bizonyítást nyert, viszont a hasonlóságok ellenére fajspecifikus különbségeket is látunk: míg csirkében intraganglionárisan is megtalálhatóak, addig egérben kizárólag a ganglionok körül jelennek meg. Feltételezzük, hogy az agrin és a kollagén XVIII a migráció szabályozásán túl egyéb, a

bélidegrendszer fejlődése szempontjából nélkülözhetetlen folyamatokban is részt vehet, ilyen a neuron és glia irányú differenciálódás szabályozása, a ganglionok kialakítása vagy a neurit extenzió modulációja. Ugyanakkor a HSPG-ok ganglion körül koncentráció elrendeződéséből barrier jellegű funkcióra is következtethetünk, mely a ganglionokat a simaizomsejtektől, mint egy ECM-kapszula különíti el. Ebben az esetben a HSPG-ok funkciója az agrin molekula agyban betöltött barrier szerepéhez lehet hasonló, ahol az agrin kapillárisok körüli bazális membránban megfigyelhető akkumulálódása a mikrovaszkuláris impermeabilitás kialakulásával és a vér-agy gátérésével egy időben következik be (Barber és Lieth 1997). Az entericus ganglionléc-eredetű sejtek és mikro környezetük részletes tanulmányozás, valamint az Ednr^b null mutáns egér disztális bélszakaszának ganglionjai körül tapasztalt kollagén XVIII és agrin expresszió hiánya nyomán valószínűsíthető, hogy a Hirschsprung-kórban megfigyelt aganglionotikus bélszakasz kialakulásáért nem csak az entericus ganglionléc-eredetű sejtek rendellenessége, hanem az ECM mintázat megváltozása együttesen tehető felelőssé.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

Ex vivo szervtenyészet és *in vivo* embriómanipulációs kísérleteink szerint, a Hirschsprung-kórra jellemző bélidegrendszeri rendellenesség kialakulásában meghatározó szerepe van a hám-mesenchyma eredetű extracelluláris kölcsönhatásoknak.

1. *In situ* hibridizációt immunfluoreszcens módszerekkel ötvözve igazoltuk, hogy a Hedgehog jelátvitel receptorai (Ptc1, Ptc2) nem expresszálódnak a ganglionléc-eredetű őssejtek felszínén.
2. Egér és csirke embrionális bélből indított szervtenyészetekkel és retrovírus mediált funkció-nyeréses kísérletekkel igazoltuk, hogy a Shh gátolja a ganglionléc-eredetű őssejtek proliferációját, elősegíti a neuronális differenciálódást és csak közvetetten, a sejt-vándorlást gátló kondroitin-szulfát proteoglikánok (CSPG; verszikán és kollagén IX) expresszióját indukálva, a mesenchymalis mikrokörnyezet módosításán keresztül befolyásolja a bélidegrendszer fejlődését.
3. A mesenchyma ECM összetételét célzó komparatív immuncitokémiai és embriómanipulációs vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a bélidegrendszert létrehozó ganglionléc-eredetű őssejtek a tenaszcin fehérjén kívül, kollagén XVIII-at és agrint is aktívan termelnek.
4. Transzgenikus egerekből izolált sejtek tenyésztésével bizonyítottuk, hogy az agrint az entericus neuronok és a glia sejtek is termelik, míg a kollagén XVIII termelés csak a glia sejtekre jellemző.
5. Sejtmigrációt vizsgáló *in vitro* kísérletekkel igazoltuk, hogy ezek a heparán-szulfát proteoglikán típusú fehérjék komplex módon szabályozzák a ganglionléc-eredetű őssejtek vándorlását: a kollagén XVIII elősegíti, az agrin pedig gátolja migrációjukat.

Eredményeink alátámasztják a ganglionléc-eredetű őssejtek autonóm szerepét, ami szerint a differenciálódó őssejtek nemcsak a környezetükből érkező impulzusokra reagálnak, hanem aktív szereplőként ECM-ot termelve, saját mikrokörnyezetük kialakításában is részt vesznek. A ganglionléc-eredetű sejtek ECM termelő funkciójának ismerete elengedhetetlen a hatékony őssejt-terápiák kidolgozásakor.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A bélidegrendszer (ENS) a béltraktus mentén vándorló, neuron és glia sejtekké differenciálódó ganglionléc-eredetű őssejtek hozzák létre. Az ENS veleszületett rendellenességei következtében súlyos neurointesztinális kórképek alakulhatnak ki, ilyen a Hirschsprung-kór, amelynek hátterében az utóbelet érintő entericus ganglionok hiánya áll. Napjainkban számos, a betegség hátterében álló génmutáció ismert, azonban keveset tudunk a bélhám-eredetű faktorok ENS fejlődésében játszott szerepéről.

A bélhám ENS fejlődésében betöltött szerepét madár és egér embrió modelleken végzett szöveti rekombináció, embrionális kiméra, szervtenyésztés, retrovírus-mediálta génextpresszió és in situ hibridizáció segítségével vizsgáltuk. A Shh-t tartalmazó retrovírus, valamint a szervtenyésztésben alkalmazott rekombináns fehérje által előidézett Shh overexpresszió Hirschsprung-kórra emlékeztető intesztinális aganglionózist eredményezett. A Shh fokozott verszikán és kollagén IX expressziót indukált. Mindez azt sugallja, hogy a Shh entericus ganglionléc-eredetű sejtek (ENCC) vándorlására kifejett hatása a verszikán és a kollagén IX közvetítésével, az ECM mintázatának megváltoztatásán keresztül fejti ki hatását a fejlődő ENS-re.

A kondroitin-szulfát proteoglikánok mellett a heparán-szulfát proteoglikán fehérjéket (kollagén XVIII és agrin) is sikerült azonosítanunk, mint az ENS fejlődésében fontos szerepet játszó szabályozó fehérjét. A kollagén XVIII dinamikus expresszálódik a csirke embrió ENS-ének fejlődése során. Ganglion mentes bélben a submucosalis és a myentericus terület kollagén XVIII expressziójának hiánya igazolható. Embriionális és felnőtt egér ganglionléc-eredetű sejtjeiből előállított idegi sejtaggregátumokban a kollagén XVIII és az agrin expresszió is megfigyelhető. Csirke-egér kimérák azt mutatják, hogy az egér belet kolonizáló csirke eredetű ENCC-ek kollagén XVIII-at és agrint termelnek. Ebből arra következtethetünk, hogy az ENCC-ek heparán-szulfát proteoglikán termelésükkel módosítják mikro környezetüket, ami befolyásolja az ENCC-ek szubsztráthoz kötődését és vándorlását.

Két humán neurointesztinális kórkép így a Hirschsprung-kór és az intesztinális neuronális diszplázia hátterében is bizonyítottan szerepet játszik a ganglionléc-eredetű sejtek vándorlásának és az ECM mintázat kialakulásának zavara. Eredményeink igazolják az epithelio-mesenchymalis kölcsönhatások és az ECM ezen neurointesztinális betegségek patogenezisében játszott esszenciális szerepét.

9. SUMMARY

The enteric nervous system (ENS) develops from neural crest cells (NCC) that migrate along the intestine, differentiate into neurons and glia, and pattern into two plexuses within the gut wall. Congenital abnormalities of the ENS cause severe intestinal disorders, such as Hirschsprung disease, which is characterized by the absence of enteric ganglia along a variable length of distal intestine. However, little is known about the role of epithelial factors in the development of ENS.

In order to clarify the role of the gut epithelium during ENS patterning, we used the avian and mouse embryos as model systems and applied a variety of techniques, including tissue recombination, embryonic chimeras, intestinal organ cultures, retrovirus-mediated gene misexpression and *in situ* hybridization. Shh overexpression, achieved *in ovo* using Shh-encoding retrovirus and in organ culture using recombinant protein, led to intestinal aganglionosis similar to that seen in Hirschsprung disease. Shh strongly induced the expression of versican and collagen type IX. These results suggest that Shh acts indirectly on the developing ENS by regulating the extracellular matrix (ECM) components present in the embryonic gut.

In addition to chondroitin sulfate proteoglycans we have identified the heparan sulfate proteoglycan (HSPG) proteins, including collagen XVIII and agrin as another important regulators of ENS development. Collagen XVIII is dynamically expressed during ENS development in the chick gut. Aganglionic hindgut leads to the loss of collagen XVIII expression in the submucosal and myenteric area, but remains strongly expressed in the epithelial basement membrane. The source of collagen XVIII around the developing ENS is unknown. Neurospheres were prepared from embryonic and adult mouse ENCC and demonstrate collagen XVIII and agrin expression within the neurospheres. Chick-mouse intestinal chimeras show that chick ENCCs colonize the mouse graft and produce collagen XVIII and agrin. We conclude that ENCCs modify their microenvironment by producing multiple HSPGs which may regulate the ENCC migration by modulating the adhesiveness of ENCCs to their substratum.

Abnormalities of NCC migration and ECM pattern formation are characteristic of two human intestinal disorders, Hirschsprung disease and intestinal neuronal dysplasia. Our results support an essential role for, epithelial-mesenchymal interaction and ECM in the pathogenesis of these neurointestinal disorders.

10. IRODALOMJEGYZÉK

- Acloque H, Wilkinson DG, Nieto MA. (2008) In situ hybridization analysis of chick embryos in whole-mount and tissue sections. *Methods Cell Biol*, 87: 169-185. doi: 10.1016/S0091-679X (08)00209-4.
- 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(2): 446-456. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.08.006.
- Allan IJ, Newgreen DF. (1980) The origin and differentiation of enteric neurons of the intestine of the fowl embryo. *Am J Anat*, 157(2): 137-154. doi: 10.1002/aja.1001570203.
- Amiel J, Lyonnet S. (2001) Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J Med Genet*, 38(11): 729–739.
- Anderson RB. (2010) Matrix metalloproteinase-2 is involved in the migration and network formation of enteric neural crest-derived cells. *Int J Dev Biol*, 54(1): 63-69. doi: 10.1387/ijdb.082667ra.
- Anderson RB, Stewart AL, Young HM. (2006a) Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways. *Cell Tissue Res*, 323(1): 11-25. doi: 10.1007/s00441-005-0047-6.
- Anderson RB, Turner KN, Nikonenko AG, Hemperly J, Schachner M, Young HM. (2006b) The Cell Adhesion Molecule L1 Is Required for Chain Migration of Neural Crest Cells in the Developing Mouse Gut. *Gastroenterology*, 130(4): 1221-1232. doi: 10.1053/j.gastro.2006.01.002.
- Asai N, Fukuda T, Wu Z, Enomoto A, Pachnis V, Takahashi M, Costantini F. (2006) Targeted mutation of serine 697 in the Ret tyrosine kinase causes migration defect of enteric neural crest cells. *Development*, 133(22): 4507-4516. doi: 10.1242/dev.02616.

- Banerjee S, Isaacman-Beck J, Schneider VA, Granato M. (2013) A Novel Role for Lh3 Dependent ECM Modifications during Neural Crest Cell Migration in Zebrafish. *PLoS One*, 8(1): e54609. doi: 10.1371/journal.pone.0054609.
- Barber AJ, Lieth E. (1997) Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. *Dev Dyn*, 208(1): 62-74. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199701)208:1<62: AID-AJA6>3.0.CO;2-#.
- Barlow A, De Graaff E, Pachnis V. (2003) Enteric Nervous System Progenitors Are Coordinately Controlled by the G Protein-Coupled Receptor EDNRB and the Receptor Tyrosine Kinase RET. *Neuron*, 40(5): 905-916. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00730-X.
- Barlow AJ, Wallace AS, Thapar N, Burns AJ. (2008) Critical numbers of neural crest cells are required in the pathways from the neural tube to the foregut to ensure complete enteric nervous system formation. *Development*, 135(9): 1681-1691. doi: 10.1242/dev.017418.
- Bayliss WM, Starling EH. (1901) The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol*, 26(3-4): 125-138. doi: 10.1113/jphysiol.1901.sp.000827.
- Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. (1994) Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*, 79:1277–1285.
- Biau S, Jin S, Fan C-M. (2013) Gastrointestinal defects of the *Gas1* mutant involve dysregulated Hedgehog and Ret signaling. *Biol Open*, 2(2): 144-155. doi: 10.1242/bio.20123186.
- Birk DE, Fitch JM, Babiarez JP, Linsenmayer TF. (1988) Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J Cell Biol*, 106(3): 999-1008. doi: 10.1083/jcb.106.3.999.
- Bódi I, Nagy N, Sinka L, Igyártó B-Z, Oláh I. (2009) Novel monoclonal antibodies recognise guinea fowl thrombocytes. *Acta Vet Hung*, 57(2): 239-246. doi: 10.1556/AVet.57.2009.2.5.

- Bolande RP. (1974) The neurocristopathies. A unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Hum Pathol*, 5(4): 409-429. doi: 10.1016/S0046-8177(74)80021-3.
- Bolande RP. (1997) Neurocristopathy: Its growth and development in 20 years. *Pediatr Pathol Lab Med*, 17(1): 1-25. doi: 10.1080/15513819709168343.
- Bondurand N, Natarajan D, Barlow A, Thepar N, Pachnis V. (2006) Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development*, 133(10): 2075-2086. doi: 10.1242/dev.02375.
- Bonnans C, Chou J, Werb Z. (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(12): 786–801. doi: 10.1038/nrm3904.
- Bourret A, Chauvet N, de Santa Barbara P, Faure S. (2017) Colonic mesenchyme differentiates into smooth muscle before its colonization by vagal enteric neural crest-derived cells in the chick embryo. *Cell Tissue Res*, 368(3): 503–511. doi: 10.1007/s00441-017-2577-0.
- Brand-Saberi B, Christ B. (2000) Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. *Curr Top Dev Biol*, 48: 1–42.
- Breau M a, Dahmani A, Broders-Bondon F, Thiery J-P, Dufour S. (2009) Beta1 integrins are required for the invasion of the caecum and proximal hindgut by enteric neural crest cells. *Development*, 136(16): 2791-2801. doi: 10.1242/dev.031419.
- Breau MA, Pietri T, Eder O, Blanche M, Brakebusch C, Fassler R, Thiery JP, Dufour S. (2006) Lack of beta1 integrins in enteric neural crest cells leads to a Hirschsprung-like phenotype. *Development*, 133(9): 1725-1734. doi: dev.02346 [pii]r10.1242/dev.02346.
- Broders-Bondon F, Paul-Gilloteaux P, Carlier C, Radice GL, Dufour S. (2012) N-cadherin and beta1-integrins cooperate during the development of the enteric nervous system. *Dev Biol*, 364(2): 178–191. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.02.001.

- Bronner-Fraser M. (1986) An antibody to a receptor for fibronectin and laminin perturbs cranial neural crest development in vivo. *Dev Biol*, 117(2): 528-536. doi: 10.1016/0012-1606(86)90320-9.
- Bronner ME, LeDouarin NM. (2012) Development and evolution of the neural crest: An overview. *Dev. Biol*, 366(1): 2-9.
- Bronner ME, Simões-Costa M. (2016) The Neural Crest Migrating into the Twenty-First Century. *Curr Top Dev Biol*, 116: 115-134.
- Brookes SJH. (2001) Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat Rec*, 262(1): 58-70. doi: 10.1002/1097-0185(20010101)262:1<58: AID-AR1011>3.0.CO;2-V.
- Burns AJ, Douarin NM. (1998) The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development*, 125(21): 4335-4347.
- Burns AJ, Champeval D, Le Douarin NM. (2000) Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Dev Biol*, 219(1): 30-43. doi: 10.1006/dbio.1999.9592.
- Burns AJ, Delalande J-MM, 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(12): 2785-2796.
- Burns AJ, Goldstein AM, Newgreen DF, Stamp L, Schäfer KH, Metzger M, Hotta R, Young HM, Andrews PW, Thapar N, Belkind-Gerson J, Bondurand N, Bornstein JC, Chan WY, Cheah K, Gershon MD, Heuckeroth RO, Hofstra RMW, Just L, Kapur RP, King SK, McCann CJ, Nagy N, Ngan E, Obermayr F, Pachnis V, Pasricha PJ, Sham MH, Tam P, Vanden Berghe P. (2016) White paper on guidelines concerning enteric nervous system stem cell therapy for enteric neuropathies. *Dev. Biol*, 417(2): 229-251.
- Cantrell VA, Owens SE, Chandler RL, Airey D.C. DC, Bradley KM, Smith JR, Southard-Smith EM. (2004) Interactions between Sox10 and EdnrB modulate

- penetrance and severity of aganglionosis in the Sox10Dom mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 13(19): 2289-2301. doi: 10.1093/hmg/ddh243.
- Carrasquillo MM, McCallion AS, Puffenberger EG, Kashuk CS, Nouri N, Chakravarti A. (2002) Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 32(2): 237-244. doi: 10.1038/ng998.
- Catala M, Teillet MA, Le Douarin NM. (1995) Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimera system. *Mech Dev*, 51(1): 51-65. doi: 10.1016/0925-4773(95)00350-A.
- Chakraborty S, Lakshmanan M, Swa HLF, Chen J, Zhang X, Ong YS, Loo LS, Aklnellar SC, Gunaratne J, Tergaonkar V, Hui KM, Hong W. (2015) An oncogenic role of Agrin in regulating focal adhesion integrity in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*, 6: 6184. doi: 10.1038/ncomms7184.
- Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J, Gershon MD. (1998) Age-dependent differences in the effects of GDNF and NT-3 on the development of neurons and glia from neural crest-derived precursors immunoselected from the fetal rat gut: Expression of GFR α -1 in vitro and in vivo. *Dev Biol*, 204(2): 385-406. doi: 10.1006/dbio.1998.9090.
- Chevalier NR, Gazquez E, Bidault L, Guilbert T, Vias C, Vian E, Watanabe Y, Muller L, Germain S, Bondurand N, Dufour S, Fleury V. (2016) How Tissue Mechanical Properties Affect Enteric Neural Crest Cell Migration. *Sci Rep*, 6: 20927. doi: 10.1038/srep20927.
- Costa M, Brookes S, Hennig G. (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*, 47 Suppl 4:iv15-19; discussion iv26. doi: 10.1136/gut.47.suppl_4.iv15.
- Cui J, Michaille JJ, Jiang W, Zile MH. (2003) Retinoid receptors and vitamin A deficiency: Differential patterns of transcription during early avian development

- and the rapid induction of RARs by retinoic acid. *Dev Biol*, 260(2): 496-511. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00257-4.
- D'Autreaux F, Margolis KG, Roberts J, Stevanovic K, Mawe G, Li Z, Karamooz N, Ahuja A, Morikawa Y, Cserjesi P, Setlick W, Gershon MD. (2011) Expression level of Hand2 affects specification of enteric neurons and gastrointestinal function in mice. *Gastroenterology*, 141(2): 576–587, 587.e1–6. doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.059.
- Darnell DK, Schoenwolf GC. (2000) The chick embryo as a model system for analyzing mechanisms of development. *Methods Mol Biol*, 135: 25–29.
- Dickson BJ, Keleman K. (2002) Netrins. *Curr Biol*, 12(5): R154-155.
- Dora D, Arciero E, Hotta R, Barad C, Bhave S, Kovacs T, Balic A, Goldstein AM, Nagy N. (2018) Intraganglionic macrophages: a new population of cells in the enteric ganglia. *J Anat*, 233(4): 401-410. doi: 10.1111/joa.12863.
- Druckenbrod NR, Epstein ML. (2005) The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev Biol*, 287(1): 125-133. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.08.040.
- Dutt S, Cassoly E, Dours-Zimmermann MT, Matasci M, Stoeckli ET, Zimmermann DR. (2011) Versican V0 and V1 direct the growth of peripheral axons in the developing chick hindlimb. *J Neurosci*, 31(14): 5262-5270. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4897-10.2011.
- Dutt S, Kléber M, Matasci M, Sommer L, Zimmermann DR. (2006) Versican V0 and V1 guide migratory neural crest cells. *J Biol Chem*, 281(17): 12123-12131. doi: 10.1074/jbc.M510834200.
- Eaker EY. (1998) Antimyenteric neuronal antibodies and motility. *Gastroenterology*, 114(2): 421–422.
- Eisen JS, Smith JC. (2008) Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development*, 135(10): 1735-1743. doi: 10.1242/dev.001115.

- Emison ES, McCallion AS, Kashuk CS, Bush RT, Grice E, Lin S, Portnoy ME, Culler DJ, Green ED, Chakravarti A. (2005) A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature*, 434(7035): 857-863. doi: 10.1038/nature03467.
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM. (1996) Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell*, 87(4): 661-673. doi: S0092-8674(00)81386-0 [pii].
- Espinosa-Medina I, Jevans B, Boismoreau F, Chettouh Z, Enomoto H, Muller T, Birchmeier C, Burns AJ, Brunet J-F. (2017) Dual origin of enteric neurons in vagal Schwann cell precursors and the sympathetic neural crest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(45): 11980–11985. doi: 10.1073/pnas.1710308114.
- Etchevers HC, Amiel J, Lyonnet S. (2006) Molecular bases of human neurocristopathies. *Adv. Exp. Med. Biol*, 589: 213-234.
- Fedtsova N, Perris R, Turner EE. (2003) Sonic hedgehog regulates the position of the trigeminal ganglia. *Dev Biol*, 261(2): 456-469. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00316-6.
- Fitch JM, Birk DE, Linsenmayer C, Linsenmayer TF. (1990) The spatial organization of Descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea. *J Cell Biol*, 110(4): 1457-1468. doi: 10.1083/jcb.110.4.1457.
- Fu M, Lui VCH, Sham MH, Pachnis V, Tam PKH. (2004) Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *J Cell Biol*, 166(5): 673-684. doi: 10.1083/jcb.200401077.
- Fu M, Sato Y, Lyons-Warren A, Zhang B, Kane MA, Napoli JL, Heuckeroth RO. (2010) Vitamin A facilitates enteric nervous system precursor migration by reducing Pten accumulation. *Development*, 137(4): 631-640. doi: 10.1242/dev.040550.
- 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(6): 550–556.

Furness JB, Costa M. (1987) The enteric nervous system. *Neuroscience*, 5: 1-20.

Furness JB. (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*, 81(1-3): 87-96.

Gandhi S, Bronner ME. (2018) Insights into neural crest development from studies of avian embryos. *Int J Dev Biol*, 62(1-2-3): 183–194. doi: 10.1387/ijdb.180038sg.

Gandhi S, Piacentino ML, Vieceli FM, Bronner ME. (2017) Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing for loss-of-function in the early chick embryo. *Dev Biol*, 432(1): 86–97. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.08.036.

Gazquez E, Watanabe Y, Broders-Bondon F, Paul-Gilloteaux P, Heysch J, Baral V, Bondurand N, Dufour S. (2016) Endothelin-3 stimulates cell adhesion and cooperates with β 1-integrins during enteric nervous system ontogenesis. *Sci Rep*, 6: 37877. doi: 10.1038/srep37877.

Gerety SS, Wilkinson DG. (2011) Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. *Dev Biol*, 350(2): 279-289. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.11.030.

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(6): 821-833. doi: 10.1016/j.mod.2005.03.003.

Goldstein AM, Hofstra RMW, Burns AJ. (2013) Building a brain in the gut: Development of the enteric nervous system. *Clin Genet*, 83(4): 307-316. doi: 10.1111/cge.12054.

Goldstein AM, Nagy N. (2008) A bird's eye view of enteric nervous system development: Lessons from the avian embryo. *Pediatr Res*, 64(4): 326-333. doi: 10.1203/PDR.0b013e31818535e8.

- Goyal RK, Hirano I. (1996) The Enteric Nervous System. *N Engl J Med*, 334(17): 1106-1115. doi: 10.1056/NEJM199604253341707.
- Graham HK, Maina I, Goldstein AM, Nagy N. (2017) Intestinal smooth muscle is required for patterning the enteric nervous system. *J Anat*, 230(4): 567–574. doi: 10.1111/joa.12583.
- Grover M, Bernard CE, Pasricha PJ, Lurken MS, Fausone-Pellegrini MS, Smyrk TC, Parkman HP, Abell TL, Snape WJ, Hasler WL, McCallum RW, Nguyen L, Koch KL, Calles J, Lee L, Tonascia J, Ünalp-Arida A, Hamilton FA, Farrugia G, Pasricha PJ, Nguyen L, Ullah N, Snape W, Bishop R, De Vole N, Greene M, Louiseau S, Parker S, Pillor E, Ponsetto C, Shetler K, Farrugia G, Grover M, Bernard C, Lurken M, Shen KR, Sarr M, Kendrick M, Parkman HP, Kantor S, Lytes V, Palit A, Sachdeva P, Simmons K, Harbison S, McCallum RW, Sarosiek I, Hejazi R, Vasquez D, Vega N, Hasler W, Atkinson M, Abell T, Fordham JA, Henry O, Kedar A, McNair AV, Spree D, Koch K, Baxter L, Calles J, Culler S, Hooker J, Stuart P, Hamilton F, James S, Torrance R, Van Raaphorst R, Tonascia J, Belt P, Donithan M, Green M, Isaacson M, Lee L, May KP, Miriel L, Ünalp-Arida A, Van Natta M, Vaughn I, Wilson L, Yates K. (2012) Clinical-histological associations in gastroparesis: Results from the Gastroparesis Clinical Research Consortium. *Neurogastroenterol Motil*, 24(6): 531-539. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01894.x.
- Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL. (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell*, 75(3): 463–476.
- Gumati MK, Magyar A, Nagy N, Kurucz É, Felföldi B, Oláh I. (2003) Extracellular matrix of different composition supports the various splenic compartments of guinea fowl (*Numida meleagris*). *Cell Tissue Res*, 312(3): 333-343. doi: 10.1007/s00441-003-0736-y.
- Gunn M. (1951) A study of the enteric plexuses in some amphibians. *Q J Microsc Sci*, 92(1): 55–77.

- Gyawali CP. (2016) Achalasia: New perspectives on an old disease. *Neurogastroenterol Motil*, 28(1): 4-11. doi: 10.1111/nmo. 12750.
- Halfter W, Dong S, Schurer B, Cole GJ. (1998) Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem*, 273(39): 25404-25412. doi: 10.1074/jbc.273.39.25404.
- Halfter W, Schurer B, Yip J, Yip L, Tsen G, Lee JA, Cole GJ. (1997) Distribution and substrate properties of agrin, a heparan sulfate proteoglycan of developing axonal pathways. *J Comp Neurol*, 383(1): 1-17. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19970623)383:1<1: AID-CNE1>3.0.CO;2-5.
- Heanue TA, Pachnis V. (2007) Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: Advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci*, 8(6): 466-479.
- Hearn CJ, Murphy M, Newgreen D. (1998) GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons in vitro. *Dev Biol*, 197(1): 93-105. doi: 10.1006/dbio.1998.8876.
- Henry MD, Satz JS, Brakebusch C, Costell M, Gustafsson E, Fassler R, Campbell KP. (2001) Distinct roles for dystroglycan, (β)1 integrin and perlecan in cell surface laminin organization. *J Cell Sci*, 114(Pt 6): 1137-1144.
- Hillier LW, Miller W, Birney E, Warren W, Hardison RC, Ponting CP, Bork P, Burt DW, Groenen MAM, Delany ME, Dodgson JB, Chinwalla AT, Cliften PF, Clifton SW, Delehaunty KD, Fronick C, Fulton RS, Graves TA, Kremitzki C, Layman D, Magrini V, McPherson JD, Miner TL, Minx P, Nash WE, Nhan MN, Nelson JO, Oddy LG, Pohl CS, Randall-Maher J, Smith SM, Wallis JW, Yang SP, Romanov MN, Rondelli CM, Paton B, Smith J, Morrice D, Daniels L, Tempest HG, Robertson L, Masabanda JS, Griffin DK, Vignal A, Fillon V, Jacobsson L, Kerje S, Andersson L, Crooijmans RPM, Aerts J, Van Der Poel JJ, Ellegren H, Caldwell RB, Hubbard SJ, Grafham DV, Kierzek AM, McLaren SR, Overton IM, Arakawa H, Beattie KJ, Bezzubov Y, Boardman PE, Bonfield JK, Croning MDR, Davies RM, Francis MD, Humphray SJ, Scott CE, Taylor RG, Tickle C, Brown WRA,

Rogers J, Buerstedde J-M, Wilson SA, Stubbs L, Ovcharenko I, Gordon L, Lucas S, Miller MM, Inoko H, Shiina T, Kaufman J, Salomonsen J, Skjoedt K, Wong GK-S, Wang J, Liu B, Wang J, Yu J, Yang H, Nefedov M, Koriabine M, DeJong PJ, Goodstadt L, Webber C, Dickens NJ, Letunic I, Suyama M, Torrents D, Von Mering C, Zdobnov EM, Makova K, Nekrutenko A, Elnitski L, Eswara P, King DC, Yang S, Tyekucheva S, Radakrishnan A, Harris RS, Chiaromonte F, Taylor J, He J, Rijnkels M, Griffiths-Jones S, Ureta-Vidal A, Hoffman MM, Severin J, Searle SMJ, Law AS, Speed D, Waddington D, Cheng Z, Tuzun E, Eichler E, Bao Z, Flicek P, Shteynberg DD, Brent MR, Bye JM, Huckle EJ, Chatterji S, Dewey C, Pachter L, Kouranov A, Mourelatos Z, Hatzigeorgiou AG, Paterson AH, Ivarie R, Brandstrom M, Axelsson E, Backstrom N, Berlin S, Webster MT, Pourquie O, Reymond A, Ucla C, Antonarakis SE, Long M, Emerson JJ, Betrán E, Dupanloup I, Kaessmann H, Hinrichs AS, Bejerano G, Furey TS, Harte RA, Raney B, Siepel A, James Kent W, Haussler D, Eyras E, Castelo R, Abril JF, Castellano S, Camara F, Parra G, Guigo R, Bourque G, Tesler G, Pevzner PA, Smit A, Fulton LA, Mardis ER, Wilson RK. (2014) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432(7018): 695-716. doi: 10.1038/nature03154.

His W. (1868) *Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbelthierleibes. Die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei.* Leipzig: Vogel; 237 pages and 12 Plates

Hofstra RMW, Wu Y, Stulp RP, Elfferich P, Osinga J, Maas SM, Siderius L, Brooks AS, Ende JJV, Heydendael VMR, Severijnen RSVM, Bax KMA, Meijers C, Buys CHCM. (2000) RET and GDNF gene scanning in Hirschsprung patients using two dual denaturing gel systems. *Hum Mutat*, 15(5): 418-429. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(200005)15:5<418: AID-HUMU3>3.0.CO;2-2.

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 D V, 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(10): 1521-1526. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2005.08.002.
- Horowitz M, Fraser RJ. (1995) Gastroparesis: diagnosis and management. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 213:7–16.
- Hoshino M, Omura N, Yano F, Tsuboi K, Kashiwagi H, Yanaga K. (2013) Immunohistochemical study of the muscularis externa of the esophagus in achalasia patients. *Dis Esophagus*, 26(1): 14-21. doi: 10.1111/j.1442-2050.2011.01318.x.
- Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M. (1994) Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*, 79(7): 1267–1276.
- Hotta R, Cheng LS, Graham HK, Pan W, Nagy N, Belkind-Gerson J, Goldstein AM. (2016) Isogenic enteric neural progenitor cells can replace missing neurons and glia in mice with Hirschsprung disease. *Neurogastroenterol Motil*, 28(4): 498-512. doi: 10.1111/nmo.12744.
- Hutson MR, Kirby ML. (2007) Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations. *Semin Cell Dev Biol*, 18(1): 101–110. doi: 10.1016/j.semcdb.2006.12.004.
- Hynes RO, Naba A. (2012) Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(1): a004903. doi: 10.1101/cshperspect. a004903.
- Iba H. (2000) Gene transfer into chicken embryos by retrovirus vectors. *Dev. Growth Differ*, 42(3): 213-218.
- Ishii Y, Mikawa T. (2005) Somatic transgenesis in the avian model system. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 75(1): 19–27. doi: 10.1002/bdrc.20033.

- Ishii Y, Reese DE, Mikawa T. (2004) Somatic transgenesis using retroviral vectors in the chicken embryo. *Dev Dyn*, 229(3): 630–642. doi: 10.1002/dvdy.10484.
- Jiang Y, Liu M tsai, Gershon MD. (2003) Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev Biol*, 258(2): 364-384. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00136-2.
- Jin S, Martinelli DC, Zheng X, Tessier-Lavigne M, Fan C-M. (2015) Gas1 is a receptor for sonic hedgehog to repel enteric axons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(1): E73-80. doi: 10.1073/pnas.1418629112.
- Kapur RP. (2000a) Developmental disorders of the enteric nervous system. *Gut*, 47 Suppl 4: iv81-83; discussion iv87. doi: 10.1136/gut.47.suppl_4.iv81.
- Kapur RP. (1999) Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos. *Pediatr Dev Pathol*, 2(6): 559–569.
- Kapur RP. (2000b) Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: Experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev Biol*, 227(1): 146-155. doi: 10.1006/dbio.2000.9886.
- Kapur RP. (2001) Neuropathology of paediatric chronic intestinal pseudo-obstruction and related animal models. *J. Pathol*, 194(3): 277-288.
- 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(1): 23-37. doi: 10.3109/15513819509026937.
- 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(1): 167-175.
- Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ. (2003) SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron*, 38(1): 17-31. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00163-6.

- Kirchgessner AL, Gershon MD. (1990) Innervation of the pancreas by neurons in the gut. *J Neurosci*, 10(5): 1626-1642.
- Kobayashi H, Hirakawa H, Surana R, O'Briain DS, Puri P. (1995) Intestinal neuronal dysplasia is a possible cause of persistent bowel symptoms after pull-through operation for Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 30(2): 253-257. doi: 10.1016/0022-3468(95)90570-7.
- Kok FO, Shin M, Ni CW, Gupta A, Grosse AS, vanImpel A, Kirchmaier BC, Peterson-Maduro J, Kourkoulis G, Male I, DeSantis DF, Sheppard-Tindell S, Ebarasi L, Betsholtz C, Schulte-Merker S, Wolfe SA, Lawson ND. (2015) Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev Cell*, 32(1): 97-108. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.018.
- Kolterud Å, 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(2): 618-628. doi: 10.1053/j.gastro.2009.05.002.
- Kos R, Tucker RP, Hall R, Duong TD, Erickson CA. (2003) Methods for introducing morpholinos into the chicken embryo. *Dev Dyn*, 226(3): 470-477. doi: 10.1002/dvdy.10254.
- Kuo BR, Erickson CA. (2010) Regional differences in neural crest morphogenesis. *Cell Adh Migr*, 4(4): 567-585. doi: 12890 [pii].
- Kurtz A, Zimmer A, Schnutgen F, Bruning G, Spener F, Muller T. (1994) The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development*, 120(9): 2637-2649.
- Lake JJ, Heuckeroth RO. (2013) Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 305(1): G1-24. doi: 10.1152/ajpgi.00452.2012.

- Lamanna C, Costagliola A, Vittoria A, Mayer B, Assisi L, Botte V, Cecio A. (1999) NADPH-diaphorase and NOS enzymatic activities in some neurons of reptilian gut and their relationships with two neuropeptides. *Anat Embryol (Berl)*, 199(5): 397-405. doi: 10.1007/s004290050238.
- Landolt R, Vaughan L, Winterhalter K, Zimmermann D. (1995) Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development*, 121(8): 2303-2312.
- Lang D, Chen F, Milewski R, Li J, Lu MM, Epstein JA. (2000) Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J Clin Invest*, 106(8): 963-971. doi: 10.1172/JCI10828.
- Lasrado R, Boesmans W, Kleinjung J, Pin C, Bell D, Bhaw L, McCallum S, Zong H, Luo L, Clevers H, Vanden Berghe P, Pachnis V. (2017) Lineage-dependent spatial and functional organization of the mammalian enteric nervous system. *Science*, 356(6339): 722-726. doi: 10.1126/science.aam7511.
- Le Douarin NM. (2004) The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: A long and still ongoing story. *Mech. Dev*, 121(9): 1089-1102.
- Le Douarin NM, Dieterlen-Lievre F, Teillet MA, Ziller C. (2000) Interspecific chimeras in avian embryos. *Methods Mol Biol*, 135: 373–386.
- Le Douarin NM, Teillet M. (1973) The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol*, 30(1): 31-48.
- Leenders E, Sieber WK. (1970) Congenital megacolon observation by Frederick Ruysch-1691. *J Pediatr Surg*, 5(1): 1-3. doi: 10.1016/0022-3468(70)90512-9.
- Lei J, Howard MJ. (2011) Targeted deletion of Hand2 in enteric neural precursor cells affects its functions in neurogenesis, neurotransmitter specification and gangliogenesis, causing functional aganglionosis. *Development*, 138(21): 4789–4800. doi: 10.1242/dev.060053.

- Liu JA-J, Lai FP-L, Gui H-S, Sham M-H, Tam PK-H, Garcia-Barcelo M-M, Hui C-C, Ngan ES-W. (2015) Identification of GLI Mutations in Patients With Hirschsprung Disease That Disrupt Enteric Nervous System Development in Mice. *Gastroenterology*, 149(7): 1837–1848.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.060.
- McCarthy KJ. (2015) The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin: Something Old, Something New. *Curr Top Membr*, 76: 255–303. doi: 10.1016/bs.ctm.2015.09.001.
- McKeown SJ, Chow CW, Young HM. (2001) Development of the submucous plexus in the large intestine of the mouse. *Cell Tissue Res*, 303(2): 301-305. doi: 10.1007/s004410000303.
- 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(1): 113-129. doi: 10.1002/wdev.57.
- McNagny KM, Pettersson I, Rossi F, Flamme I, Shevchenko A, Mann M, Graf T. (1997) Thrombomucin, a novel cell surface protein that defines thrombocytes and multipotent hematopoietic progenitors. *J Cell Biol*, 138(6): 1395-1407. doi: 10.1083/jcb.138.6.1395.
- Meier-Ruge W, Brönnimann P, Gambazzi F, Schmid P, Schmidt B, Stoss F. (1995) Histopathological criteria for intestinal neuronal dysplasia of the submucosal plexus (type B). *Virchows Arch*, 426(6): 549-556. doi: 10.1007/BF00192108.
- Memic F, Knoflach V, Sadler R, Tegerstedt G, Sundstrom E, Guillemot F, Pachnis V, Marklund U. (2016) *Ascl1* Is Required for the Development of Specific Neuronal Subtypes in the Enteric Nervous System. *J Neurosci*, 36(15): 4339–4350. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0202-16.2016.
- Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K, Rosenthal A. (1996) Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, 382(6586): 76-79. doi: 10.1038/382076a0.

- 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(6): 1402-1411. doi: 10.1002/dvdy.22630.
- Nagashimada M, Ohta H, Li C, Nakao K, Uesaka T, Brunet JF, Amiel J, Trochet D, Wakayama T, Enomoto H. (2012) Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression. *J Clin Invest*, 122(9): 3145-3158. doi: 10.1172/JCI63401.
- Nagy N, Biro E, Takacs A, Polos M, Magyar A, Olah I. (2005) Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. *Dev Dyn*, 232(1): 55–66. doi: 10.1002/dvdy.20212.
- Nagy N, Brewer KC, Mwizerwa O, Goldstein AM. (2007) Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. *Dev Dyn*, 236(1): 73-83. doi: 10.1002/dvdy.20933.
- Nagy N, Burns AJ, Goldstein AM. (2012) Immunophenotypic characterization of enteric neural crest cells in the developing avian colorectum. *Dev Dyn*, 241(5): 842-851. doi: 10.1002/dvdy.23767.
- Nagy N, Goldstein AM. (2017) Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Semin Cell Dev Biol*, 66: 94-106. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.01.006.
- Nagy N, Goldstein AM. (2006a) Intestinal coelomic transplants: A novel method for studying enteric nervous system development. *Cell Tissue Res*, 326(1): 43-55. doi: 10.1007/s00441-006-0207-3.
- Nagy N, Goldstein AM. (2006b) Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev Biol*, 293(1): 203-217. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.01.032.
- Nagy N, Magyar A, Oláh I. (2001) A novel monoclonal antibody identifies all avian embryonic myogenic cells and adult smooth muscle cells. *Anat Embryol (Berl)*, 204(2): 123-134. doi: 10.1007/s004290100192.

- 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(2): 263-272. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.03.025.
- Newgreen D, Thiery JP. (1980) Fibronectin in early avian embryos: Synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. *Cell Tissue Res*, 211(2): 269-291. doi: 10.1007/BF00236449.
- Newgreen DF, Hartley L. (1995) Extracellular matrix and adhesive molecules in the early development of the gut and its innervation in normal and spotting lethal rat embryos. *Acta Anat (Basel)*, 154(4): 243–260.
- Newgreen DF, Jahnke I, Allan IJ, Gibbins IL. (1980) Differentiation of sympathetic and enteric neurons of the fowl embryo in grafts to the chorio-allantoic membrane. *Cell Tissue Res*, 208(1): 1-19. doi: 10.1007/BF00234168.
- Ngan ES-W, Garcia-Barcelo M-M, Yip BH-K, Poon H-C, Lau S-T, Kwok CK-M, Sat E, Sham M-H, Wong KK-Y, Wainwright BJ, Cherny SS, Hui C-C, Sham PC, Lui VC-H, Tam PK-H. (2011) Hedgehog/Notch-induced premature gliogenesis represents a new disease mechanism for Hirschsprung disease in mice and humans. *J Clin Invest*, 121(9): 3467–3478. doi: 10.1172/JCI43737.
- Nishiyama C, Uesaka T, Manabe T, Yonekura Y, Nagasawa T, Newgreen DF, Young HM, Enomoto H. (2012) Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nat Neurosci*, 15(9): 1211-1218. doi: 10.1038/nn.3184.
- Oakley R, Lasky C, Erickson C, Tosney K. (1994) Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in the chicken embryo. *Development*, 120(1): 103-114.
- Obermayr F, Hotta R, Enomoto H, Young HM. (2013) Development and developmental disorders of the enteric nervous system. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(1): 43-57. doi: 10.1038/nrgastro.2012.234.

- Okamoto N, Del Maestro R, Valero R, Monros E, Poo P, Kanemura Y, Yamasaki M. (2004) Hydrocephalus and Hirschsprung's disease with a mutation of L1CAM. *J Hum Genet*, 49(6): 334-337. doi: 10.1007/s10038-004-0153-4.
- Oláh I, Gumati KH, Nagy N, Magyar A, Kaspers B, Lillehoj H. (2002) Diverse expression of the K-1 antigen by cortico-medullary and reticular epithelial cells of the bursa of Fabricius in chicken and guinea fowl. *Dev Comp Immunol*, 26(5): 481-488. doi: 10.1016/S0145-305X(01)00094-5.
- Paratore C, Eichenberger C, Suter U, Sommer L. (2002) Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 11(24): 3075-3085. doi: 10.1093/hmg/11.24.3075.
- Parikh DH, Leibl M, Tam PK, Edgar D. (1995) Abnormal expression and distribution of nidogen in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 30(12): 1687-1693.
- Parikh DH, Tam PK, Lloyd DA, Velzen D Van, Edgar DH. (1992a) Quantitative and qualitative analysis of the extracellular matrix protein, laminin, in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 27(8): 991-995.
- Parikh DH, Tam PK, Van Velzen D, Edgar D. (1992b) Abnormalities in the distribution of laminin and collagen type IV in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology*, 102(4 Pt 1): 1236-1241. doi: 10.1016/0022-3468(93)90062-P.
- Parikh DH, Tam PK, Van Velzen D, Edgar D. (1994) The extracellular matrix components, tenascin and fibronectin, in Hirschsprung's disease: an immunohistochemical study. *J Pediatr Surg*, 29(10): 1302-1306.
- Patrick A, Epstein O. (2008) Review article: gastroparesis. *Aliment Pharmacol Ther*, 27(9): 724-740. doi: 10.1111/j.1365-2036.2008.03637.x.
- Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF. (1999) The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature*, 399(6734): 366-370. doi: 10.1038/20700.

- Payette RF, Tennyson VM, Pomeranz HD, Pham TD, Rothman TP, Gershon MD. (1988) Accumulation of components of basal laminae: association with the failure of neural crest cells to colonize the presumptive aganglionic bowel of ls/l^s mutant mice. *Dev Biol*, 125(2): 341–360.
- Perris R, Perissinotto D. (2000) Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech. Dev*, 95(1-2): 3-21.
- Perris R, Perissinotto D, Pettway Z, Bronner-Fraser M, Morgelin M, Kimata K. (1996) Inhibitory effects of PG-H/aggrecan and PG-M/versican on avian neural crest cell migration. *FASEB J.*, 10(2): 293-301.
- Ramalho-Santos M, Melton D, McMahon P. (2000) Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development*, 127(12): 2763-2772. doi: 10.1007/BF03270579.
- Rehberg S, Lischka P, Glaser G, Stamminger T, Wegner M, Rosorius O. (2002) Sox10 is an active nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for Sox10-mediated transactivation. *Mol Cell Biol*, 22(16): 5826–5834.
- 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(1): 52-64. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.02.061.
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 75(7): 1401-1416. doi: 10.1016/0092-8674(93)90626-2.
- Ring C, Hassell J, Halfter W. (1996) Expression pattern of collagen IX and potential role in the segmentation of the peripheral nervous system. *Dev Biol*, 180(1): 41-53. doi: 10.1006/dbio.1996.0283.
- Roberts DJ. (2000) Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract. *Dev Dyn*, 219(2): 109-120. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<:AID-DVDY1047>3.0.CO;2-6.

- Roberts DJ, Johnson RL, Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. (1995) Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development*, 121(10): 3163-3174.
- Sasaki T, Fukai N, Mann K, Göhring W, Olsen BR, Timpl R. (1998) Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.*, 17(15): 4249-4256. doi: 10.1093/emboj/17.15.4249.
- Sasselli V, Pachnis V, Burns AJ. (2012) The enteric nervous system. *Dev. Biol*, 366(1): 64-73. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.01.012.
- Sato N, Matsuda K, Sakuma C, Foster DN, Oppenheim RW, Yaginuma H. (2002) Regulated gene expression in the chicken embryo by using replication-competent retroviral vectors. *J Virol*, 76(4): 1980–1985.
- Schemann M. (2005) Control of gastrointestinal motility by the “gut brain” -the enteric nervous system. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 41 Suppl 1: S4-6. doi: 10.1097/01.scs.0000180285.51365.55.
- Schulte-Merker S, Stainier DYR, Auer TO, Bene F Del, Beumer KJ, Trautman JK, Bozas A, Liu J-L, Rutter J, Gall JG, Carroll D, Chakrabarti S, Streisinger G, Singer F, Walker C, Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, Zhu X, Xiong J-W, Xi JJ, Dahlem TJ, Hoshijima K, Jurynek MJ, Gunther D, Starker CG, Locke AS, Weis AM, Voytas DF, Grunwald DJ, Davidson E, Giacco L Del, Pistocchi A, Ghilardi A, Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhaus SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkruis F, Abdelilah S, Rangini Z, Eisen JS, Smith JC, Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK, Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, Eeden FJ van, Jiang YJ, Heisenberg CP, Heasman J, Kofron M, Wylie C, Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, Heinrich V, Hecht J, Haass C, Schmid B, Huang P, Xiao A, Zhou M, Zhu Z, Lin S, Zhang B, Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh J-RJ, Joung JK, Nasevicius A, Ekker SC, Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK, Robu ME, Larson JD,

Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA, Ekker SC, Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, Yeh J-RJ, Shestopalov IA, Pitt CL, Chen JK, Summerton JE, Tao S, Witte M, Bryson-Richardson RJ, Currie PD, Hogan BM, Schulte-Merker S, Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, Santiago Y, Vincent AI, Meng X, Zhang L, Impel A van, Zhao Z, Hermkens DMA, Roukens MG, Fischer JC, Peterson-Maduro J, Duckers H, Ober EA, Ingham PW, Schulte-Merker S, Wienholds E, Schulte-Merker S, Walderich B, Plasterk RHA, Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R, Zu Y, Tong X, Wang Z, Liu D, Pan R, Li Z, Hu Y, Luo Z, Huang P, Wu Q. (2014) Out with the old, in with the new: reassessing morpholino knockdowns in light of genome editing technology. *Development*, 141(16): 3103-3104. doi: 10.1242/dev.112003.

Seaman C, Anderson R, Emery B, Cooper HM. (2001) Localization of the netrin guidance receptor, DCC, in the developing peripheral and enteric nervous systems. *Mech Dev*, 103(1-2): 173-175. doi: 10.1016/S0925-4773(01)00350-1.

Serbedzija GN, Burgan S, Fraser SE, Bronner-Fraser M. (1991) Vital dye labelling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos. *Development*, 111(4): 857-866.

Shellito PC, Warshaw AL. (1984) Idiopathic intermittent gastroparesis and its surgical alleviation. *Am J Surg*, 148(3): 408-412. doi: 10.1016/0002-9610(84)90483-5.

Simkin JE, Zhang D, Rollo BN, Newgreen DF. (2013) Retinoic Acid Upregulates Ret and Induces Chain Migration and Population Expansion in Vagal Neural Crest Cells to Colonise the Embryonic Gut. *PLoS One*, 8(5): e64077. doi: 10.1371/journal.pone.0064077.

Skaba R. (2007) Historic milestones of Hirschsprung's disease (commemorating the 90th anniversary of Professor Harald Hirschsprung's death). *J Pediatr Surg*, 42(1): 249-251.

Smoak IW, 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(2): 357-372. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.04.029.
- Soret R, Mennetrey M, Bergeron KF, Dariel A, Neunlist M, Grunder F, Faure C, Silversides DW, Pilon N. (2015) A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease. *J Clin Invest*, 125(12): 4483-4496. doi: 10.1172/JCI83178.
- Southard-Smith EM, Kos L, Pavan WJ. (1998) Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom hirschsprung mouse model. *Nat Genet*, 18(1): 60-64. doi: 10.1038/ng0198-60.
- Stern CD. (2005) The chick: A great model system becomes even greater. *Dev Cell*, 8(1): 9-17. doi: 10.1016/S1534-5807(04)00425-3.
- Streit A, Tambalo M, Chen J, Grocott T, Anwar M, Sosinsky A, Stern CD. (2013) Experimental approaches for gene regulatory network construction: the chick as a model system. *Genesis*, 51(5): 296-310. doi: 10.1002/dvg.22359.
- Su J, Stenbjorn RS, Gorse K, Su K, Hauser KF, Ricard-Blum S, Pihlajaniemi T, Fox MA. (2012) Target-Derived Matricryptins Organize Cerebellar Synapse Formation through $\alpha3\beta1$ Integrins. *Cell Rep*, 2(2): 223-230. doi: 10.1016/j.celrep.2012.07.001.
- 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(9): 1971-1980.
- 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(15): 551-556. doi: 10.1056/NEJM194910132411501.
- Szabo A, Melchionda M, Nastasi G, Woods ML, Campo S, Perris R, Mayor R. (2016) In vivo confinement promotes collective migration of neural crest cells. *J Cell Biol*, 213(5): 543-555. doi: 10.1083/jcb.201602083.

- Tanaka H, Kinutani M, Agata A, Takashima Y, Obata K. (1990) Pathfinding during spinal tract formation in the chick-quail chimera analysed by species-specific monoclonal antibodies. *Development*, 110(2): 565-571.
- Tennyson VM, Payette RF, Rothman TP, Gershon MD. (1990) Distribution of hyaluronic acid and chondroitin sulfate proteoglycans in the presumptive aganglionic terminal bowel of ls/ls fetal mice: an ultrastructural analysis. *J Comp Neurol*, 291(3): 345–362. doi: 10.1002/cne.902910303.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK (2016) Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 97: 4–27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001
- Timmermans JP, Hens J, Adriaensen D. (2001) Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anat Rec*, 262(1): 71–78.
- Uchikawa M, Takemoto T, Kamachi Y, Kondoh H. (2004) Efficient identification of regulatory sequences in the chicken genome by a powerful combination of embryo electroporation and genome comparison. *Mech Dev*, 121(9): 1145–1158. doi: 10.1016/j.mod.2004.05.009.
- Uesaka T, Nagashimada M, Enomoto H. (2015) Neuronal Differentiation in Schwann Cell Lineage Underlies Postnatal Neurogenesis in the Enteric Nervous System. *J Neurosci*, 35(27): 9879-9888. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1239-15.2015.
- Uesaka T, Nagashimada M, Enomoto H. (2013) GDNF Signaling Levels Control Migration and Neuronal Differentiation of Enteric Ganglion Precursors. *J Neurosci*, 33(41): 16372-16382. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2079-13.2013.
- Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ, De Laet MH. (1992) Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N Engl J Med*, 327(8): 511-515.
- 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(9): 920-925. doi: 10.1016/S0022-3468(89)80595-0.
- Verne GN, Sallustio JE, Eaker EY. (1997) Anti-myenteric neuronal antibodies in patients with achalasia. A prospective study. *Dig Dis Sci*, 42(2): 307-313. doi: 10.1023/A:1018857617115.
- Vielmetter J, Stolze B, Bonhoeffer F, Stuermer CAO. (1990) In vitro assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells. *Exp Brain Res*, 81(2): 283-287. doi: 10.1007/BF00228117.
- 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(3): 367-382. doi: 10.1007/s00441-004-1023-2.
- Wallace AS, Tan MX, Schachner M, Anderson RB. (2011) L1cam acts as a modifier gene for members of the endothelin signalling pathway during enteric nervous system development. *Neurogastroenterol Motil*, 23(11): e510-522. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01692.x.
- Wallace KN, Akhter S, Smith EM, Lorent K, Pack M. (2005) Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech Dev*, 122(2): 157-173. doi: 10.1016/j.mod.2004.10.009.
- Wang Y, Wang J, Pan W, Zhou Y, Xiao Y, Zhou K, Wen J, Yu T, Cai W. (2013) Common Genetic Variations in Patched1 (PTCH1) Gene and Risk of Hirschsprung Disease in the Han Chinese Population. *PLoS One*, 8(9): e75407. doi: 10.1371/journal.pone.0075407.
- Weskamp G, Reichardt LF. (1991) Evidence that biological activity of NGF is mediated through a novel subclass of high affinity receptors. *Neuron*, 6(4): 649-663. doi: 10.1016/0896-6273(91)90067-A.
- Winder SJ. (2001) The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem. Sci*, 26(2): 118-124.

- Wray CJ, Rich TA, Waguespack SG, Lee JE, Perrier ND, Evans DB. (2008) Failure to recognize multiple endocrine neoplasia 2B: More common than we think? *Ann Surg Oncol*, 15(1): 293-301. doi: 10.1245/s10434-007-9665-4.
- Yamada S, Nomura T, Uebersax L, Matsumoto K, Fujita S, Miyake M, Miyake J. (2007) Retinoic acid induces functional c-Ret tyrosine kinase in human neuroblastoma. *Neuroreport*, 18(4): 359-363. doi: 10.1097/WNR.0b013e32801299b4.
- Yamagishi S, Kesavamoorthy G, Bastmeyer M, Sato K. (2016) Stripe Assay to Study the Attractive or Repulsive Activity of a Protein Substrate Using Dissociated Hippocampal Neurons. *J Vis Exp*, (112): 54096. doi: 10.3791/54096.
- Yang JT, Liu CZ, Villavicencio EH, Yoon JW, Walterhouse D, Iannaccone PM. (1997) Expression of human GLI in mice results in failure to thrive, early death, and patchy Hirschsprung-like gastrointestinal dilatation. *Mol Med*, 3(12): 826-835.
- Yntema CL, Hammond WS. (1954) The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol*, 101(2): 515-541. doi: 10.1002/cne.901010212.
- Yntema CL, Hammond WS. (1955) Experiments on the origin and development of the sacral autonomic nerves in the chick embryo. *J Exp Zool*, 129: 375-414. doi: 10.1002/jez.1401290210.
- You CH, Chey WY, Lee KY, Menguy R, Bortoff A. (1981) Gastric and small intestinal myoelectric dysrhythmia associated with chronic intractable nausea and vomiting. *Ann Intern Med*, 95(4): 449-451. doi: 10.7326/0003-4819-95-4-449.
- Young HM, Bergner AJ, Anderson RB, Enomoto H, Milbrandt J, Newgreen DF, Whittington PM. (2004) Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut. *Dev Biol*, 270(2): 455-473. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.03.015.

- Young HM, Bergner AJ, Simpson MJ, McKeown SJ, Hao MM, Anderson CR, Enomoto H. (2014) Colonizing while migrating: How do individual enteric neural crest cells behave? *BMC Biol*, 12: 23. doi: 10.1186/1741-7007-12-23.
- Young HM, Hearn CJ, Ciampoli D, Southwell BR, Brunet JF, Newgreen DF. (1998) A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture. *Dev Biol*, 202(1): 67-84. doi: 10.1006/dbio.1998.8987.
- Young HM, Newgreen D. (2001) Enteric neural crest-derived cells: Origin, identification, migration, and differentiation. *Anat Rec*, 262(1): 1-15. doi: 10.1002/1097-0185(20010101)262:1<1: AID-AR1006>3.0.CO;2-2.
- Zanin MKB, Bundy J, Ernst H, Wessels A, Conway SJ, Hoffman S. (1999) Distinct spatial and temporal distributions of aggrecan and versican in the embryonic chick heart. *Anat Rec*, 256(4): 366-380. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(19991201)256:4<366: AID-AR4>3.0.CO;2-#.
- Zhang S, Chen F, Jiang K, Yuan Z, Wang W. (2014) Comparative proteomic profiles of the normal and aganglionic hindgut in human Hirschsprung disease. *Pediatr Res*, 75(6): 754-761. doi: 10.1038/pr.2014.33.
- Zhu L, Lee HO, Jordan CRS, Cantrell VA, Southard-Smith EM, Shin MK. (2004) Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors. *Nat Genet*, 36(7): 732-737. doi: 10.1038/ng1371.
- Zimmer J, Puri P. (2015) Knockout mouse models of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*, 31(9): 787-794. doi: 10.1007/s00383-015-3747-3.
- Zong Y, Jin R. (2013) Structural mechanisms of the agrin-LRP4-MuSK signaling pathway in neuromuscular junction differentiation. *Cell Mol Life Sci*, 70(17): 3077-3088. doi: 10.1007/s00018-012-1209-9.

Zuhdi N, Ortega B, Giovannone D, Ra H, Reyes M, Ascención V, McNicoll I, Ma L, de Bellard ME. (2015) Slit molecules prevent entrance of trunk neural crest cells in developing gut. *Int J Dev Neurosci*, 41: 8-16. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.12.003.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Nagy N, **Barad C**, Graham HK, Hotta R, Cheng LS, Fejszak N, Goldstein AM. (2016) Sonic hedgehog controls enteric nervous system development by patterning the extracellular matrix. *Development*, 143(2): 264-275. doi:10.1242/dev.128132.

IF: 5,843

Nagy N*, **Barad C***, Hotta R, Bhave S, Arciero E, Dora D, Goldstein A.M. (2018) Collagen 18 and agrin are secreted by enteric neural crest cells to remodel their microenvironment and regulate their migration during ENS development. *Development*, 145(9). pii: dev160317. doi:10.1242/dev.160317.

IF: 5,413

(*megosztott első szerzőség)

11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

Dora D, Arciero E, Hotta R, **Barad C**, Bhave S, Kovacs T, Balic A, Goldstein AM, Nagy N. (2018) Intraganglionic macrophages: a new population of cells in the enteric ganglia. *J Anat*, 233(4): 401-410. doi: 10.1111/joa.12863.

IF: 2,479

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. habil. Nagy Nándor egyetemi docensnek, a Semmelweis Egyetem Össejt és Kísérletes Embriológia Laboratórium vezetőjének, aki biztosította számomra a kutatás feltételeit, munkámat szakmailag és emberileg támogatta.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Oláh Imre egyetemi tanárnak szakmai támogatásáért és bátorító szavaiért.

Köszönöm Prof. Dr. Szél Ágoston intézetigazgatónak, hogy lehetővé tette posztgraduális tanulmányaim végzését a Semmelweis Egyetem Anatómia, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Alpár Alán egyetemi tanárnak disszertációm alapos bírálata során megfogalmazott konstruktív észrevételeiért.

Külön köszönöm PhD hallgatótársamnak, Dr. Dóra Dávidnak disszertációm összeállítására során nyújtott segítségét.

Hálával tartozom továbbá laboratóriumunk valamennyi jelenlegi és egykori munkatársának Dr. Kocsis Katalinnak, Dr. Minkó Krisztinának, Dr. Bódi Ildikónak, Dr. Molnár Dávidnak, Fejszák Nórának, Kovács Tamásnak, Halasy Viktóriának, Fügedi Jutkának, Fölker Orsolyának, Orbán Editnek, Kovács Adriennek, Vidra Györgynének és Orbán Lilinek, akik segítségemre voltak kutatási és oktatási feladataim elvégzése, valamint disszertációm elkészítése során.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom családomnak, amiért munkám során mindvégig mellettem álltak.