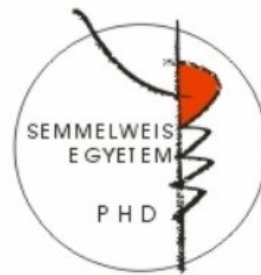


Az epithelio-mesenchymalis kölcsönhatások és az extracelluláris mátrix szerepe a bélidegrendszer fejlődésében

Doktori tézisek

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

1. BEVEZETÉS

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. Automáciájának és morfológiai sajátosságainak (a béltraktusban található idegsejtek száma meghaladja a gerincvelő idegsejtjeinek számát) jóvoltából gyakran „második agyként” is emlegetik. Kísérleti munkánk során kiemelten foglalkoztunk a Hirschsprung-kórral, amit a ganglionléc-eredetű sejtek rostrocaudalis irányú migrációjának zavara következtében kialakuló disztális bélrendszeri aganglionózis jellemez.

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. 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. Mára számos, a bélidegrendszer fejlődésében és rendellenességei patomechanizmusában részt vevő molekuláris faktort sikerült azonosítani: 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 bélepitheliumból szekretált faktorok entericus ganglionléc-eredetű sejtek vándorlására és proliferációjára kifejtett hatásának szerepe is gyakran felvetődik. Míg a bélhamban termelődő netrinnről ismert, hogy a vándorló ganglionléc-eredetű sejtekre kemoattraktáns hatást gyakorol, addig a Hedgehog fehérjék részvétele egyelőre kevésbé tisztázott. Fu és munkatársai szerint, izolált egér vastagbél tenyészetében a Shh gátolja a ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását és differenciálódását. 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. 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 és egér embriót használtuk. A madár embrió könnyű hozzáférhetősége és manipulálhatósága miatt lehetővé teszi a különböző korban izolált bélszakaszok szervtenyésztést, a chorioallantois membrántenyésztést, az embrionális kimérák előállítását és a retrovírus-mediált génexpressziót. Az irodalmi adatokból megismert különböző kísérleti modell embriókban kapott eltérő eredmények szükségessé tették a Hedgehog fehérjék receptorainak (Ptc1 és Ptc2) expressziós mintázatának meghatározását. A Shh receptorok expressziójának entericus ganglionléc-eredetű sejteken megfigyelhető hiánya és az a régóta ismert tény, 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 felveti annak a lehetőségét, hogy az Shh gátló hatása nem a bélidegrendszer sejtjein közvetlenül, hanem az entericus ganglionléc-eredetű sejteket fogadó mikrokörnyezet módosításán keresztül érvényesül.

Az eddigi adatok alapján elmondható, hogy Hirschsprung-kórban a ganglionotikus és az aganglionotikus bélszakasz között bár megfigyelték a mátrix molekulák expressziójának eltérését, ennek ellenére a fehérjék pontos expressziója, hatásmechanizmus, illetve fejlődésben betöltött szerepe mindmáig nem ismert. Kísérleti munkánk második részében részletesebben igyekeztünk karakterizálni a vándorló entericus ganglionléc-eredetű sejtek és az extracelluláris mikrokörnyezet közötti kölcsönhatást, mely kapcsán egyre inkább megalapozottnak tűnik, hogy az entericus ganglionléc-eredetű sejtek nem pusztán válaszolnak környezetükre, hanem aktívan modulálják is azt.

2. CÉLKITÚZÉSEK

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 sejttranszplantációt 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 extracelluláris mátrix expressziós mintázatának jellemzése a bélidegrendszer normál és patológiás fejlődése során.

3. MÓDSZEREK

3.1. 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 forgatórácsos inkubáltuk, 38 °C-on, 90%-os páratartalom mellett. Az endothelin receptor B (*EdnrB^{-/-}*) (*Ednrbtm1Ywa/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.

3.2. A minták szövettani feldolgoása

Az embriókból kipreparált vékony- és vastagbélszakaszokból immuncitokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatok céljából zselatinos-fagyasztott blokkokat készítettünk. 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 PBS oldatában 4°C-on inkubáltuk. A beágyazást megelőzően 37°C-on, 1 órán keresztül, 15% szacharózt és 7,5% zselatint tartalmazó PBS elegyében inkubáltuk. A blokkokat folyékony nitrogénnel -50°C-ra hűtött izopentánban (2-metilbután) körülbelül 1 perc alatt lefagyasztottuk és a metszetek készítéséig -80°C-on tároltuk. A zselatinos blokkokat Shandon gyártmányú kriótómmal -24°C-os munkahőmérsékleten metszettük le. A kloronaftolos és immunfluoreszcens fénymikroszkópos feldolgozáshoz a mintákból 12 µm-es metszeteket készítettünk.

3.3. Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia, metszetek fényképezése, feldolgozása

A fagyasztott metszetekből a zselatin kioldását 37C°-ra felmelegített PBS-ben végeztük (3-5 perc), majd a PBS-t szobahőmérsékletűre cserélve tovább 5-7 percig rehidráltuk. Ezt követően a metszetekre ráértük a primer ellenanyagokat (50-80 µl/metszet). A következő lépésben a metszetekre biotinnal konjugált anti-egér IgG, anti-egér IgM, anti tengerimalac IgG, illetve anti-nyúl IgG szekunder ellenanyagot mértünk és további 45 percig szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltuk. A szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolása céljából a metszeteket 10 percre PBS-el 3%-ra hígított H₂O₂-ba helyeztük. A mosás után az ABC komplexet (avidin-biotin-peroxidáz komplex) vittük fel a metszetekre és fél órán át inkubáltuk. A kötődött peroxidáz enzim aktivitását 4-chloro-1-naftollal detektáltuk. Néhány esetben a mikroszkópos vizsgálatokat nem metszeteken, hanem teljes béldarabokon végeztük, mely során a kipreparált béldarabra a primer ellenanyagból körülbelül 300 µl-t mértünk rá oly módon, hogy az a béldarabot teljesen ellepje. Az 1 órás rázógépen történő inkubálást követően a peroxidázzal jelzett anti-egér IgG szekunder ellenanyaggal szintén 1 órát inkubáltuk. Utolsó lépésként diamino-benzidin (DAB) kromogén segítségével tettük láthatóvá az immunreakciót. Immunfluoreszcens festések alkalmával 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 vagy biotinnal konjugált ellenanyag. A biotinilált szekunder ellenanyagok bekötődésének detektálására streptavidinnel konjugált fluorokrómot alkalmaztunk, mely ismételten 45 perces, fénytől védett inkubálást igényelt. A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6 diamino-2-phenylindole, dihydrochloride) reagenst használtunk. 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.

3.4. *In situ* hibridizáció

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

3.5. Embriótenyésztés

Kísérleteink során a 5 napos embriókból izolált középbelet és utóbelet tartalmazó bélszakaszt I-es típusú kollagén alapú mátrixba ágyazva 48-72 óráig tenyésztettük. A tenyésztést erre alkalmas tenyésztőedényekben végeztük (Falcon Center-Well Organ Culture Dish). A tenyésztő tálca közepébe kollagén mátrixot (700 µl DMEM-et (tenyésztő tápoldat), 6 µl 1N NaOH-ot és 294 µl kollagént (rat tail 3,38%)), 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. A kollagénbe oldva a Shh (1 µg/ml) növekedési faktornak és inhibitorának a cyclopamine-nak (1-3 µM), valamint a mesenchymalis eredetű GDNF-nek (10-20 µM) a hatását vizsgáltuk.

3.6. Chorioallantois membrántenyésztés (CAM)

A kísérleteink során izolált embrionális szerveket a hosszabb ideig *in vivo* körülményekhez hasonló milióban történő tenyésztés érdekében 9 napos csirke embriók chorioallantois membránjára transzplantáltuk, majd az adott kísérlettől függően 7-9 napig laboratóriumunk keltetőgépében inkubáltuk.

3.7. Shh-RCAS retrovírus és cyclopamine mikroinjektálása

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 üvegkapillárison keresztül 5 napos embriók vastagbelébe 2-5 µl Shh-RCAS retrovírus szuszpenziót vagy Cyclopamine-t (3 µM)

injektáltunk. Ezt követően a bélszakaszokat 9 napos embriók chorioallantois membránjára transzplantálva további 9 napon keresztül tenyésztettük.

3.8. Egér-csirke testüregkiméra

A testüreg kimérákat Nagy és Goldstein által korábban leírtaknak megfelelően állítottuk össze. A 11.5 napos egér embriókból kiperarált 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 tojánhéjon, majd a héjhártya és az amnion megnyitásával szabaddá tettük az embriót. Steril tűvel végzett hosszanti bevágást követően az egér embrióból kiperarált bélszakaszt tompa végű üveg pipetta segítségével a fogadó embrióba helyeztük és további 9 napig inkubáltuk. (A kimérák túlélési rátája (n=9) 65-70% között volt.)

3.9. Idegi sejtaggregátumok beültetése aneurális csirke utóbélbe

A Dr. Ryo Hotta (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School Boston) által rendelkezésünkre bocsátott Wnt1;tdT egérbélből spontán generált idegi sejtaggregátumokat (neurosphere), 5 napos csirke embrióból kiperarált utóbél proximális szakaszába implantáltuk. A rekombinációt követően a bélszakaszokat 9 napos fogadó embrió chorioallantois membránjára transzplantálva további 7 napig tenyésztettük, majd szövettanilag feldolgoztuk (n=25).

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

Prof. Martin Bastmeyer (Karlsruhe Institute of Technology, Germany) által rendelkezésünkre bocsátott szilikon matricák segítségével egy 6 cm átmérőjű műanyag tenyészedényre körülbelül 90 µm szélességű sávokban kontroll (10 µg/ml laminin és 20 µg/ml fibronectin) és vizsgálni kívánt extracelluláris mátrix molekulákat (2 µg/ml agrin vagy 50 µg/ml endosztatin) vittünk fel. Az extracelluláris mátrix sávokra merőleges orientációban 7 napos csirke embrióból származó középbelet helyeztünk, majd kis mennyiségű szérumentes, penicillin-streptomocint tartalmazó DMEM tenyészmediummal fedtük be. Inkubálást követően a tenyészethez 10 ng/ml GDNF

tartalmú DMEM-et adtunk. Az entericus ganglionléc-eredetű sejtek sávokon történő migrációs távolságát 24 óra elteltével értékeltük.

Az entericus ganglionléc-eredetű sejtek migrációs képességét Chakraborty munkacsoportja által leírtak szerint is megismételtük. A Wnt1;tdT-eredetű idegi sejtaggregátumokat 20 µg/ml fibronectinnel bevont felületen szérum-mentes DMEM-ben, illetve 20 µg/ml funkció-blokkoló agrin antitestet tartalmazó médiumban tenyésztettük. A sejtváándorlást 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. Összeállításonként 3-4 idegi sejtaggregátumot vizsgáltunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A hám eredetű Shh növekedési faktor szerepe a bélidegrendszer fejlődésében

4.1.1. A *Sonic hedgehog* gátolja az embrionális vastagbél bélidegrendszerének fejlődését

A Shh jelátvitel bélidegrendszer fejlődésében betöltött szerepét morfológiai (hisztokémia, immuncitokémia, kettős immunfluoreszcencia, konfokális mikroszkópia), sejtbioológiai (szervtenyésztés, retrovírus-mediált génexpresszió, migrációs assay) és fejlődésbiológiai (chorioallantois membrántenyésztés, testüregkiméra, mikrogyöngy beültetés, szöveti rekombináció) módszereket ötvözve vizsgáltuk.

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. Amikor a Hedgehog jelátvitelt gátló cyclopamine hatását követtük nyomon (szervtenyésztés, chorioallantois membrán graft), minden esetben intenzív bélidegrendszeri proliferációt és hiperganglionózist figyeltünk meg. A cyclopamine-nal kezelt és nem kezelt tenyészetek esetében a bélfali 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. A Shh kezelés általánosan stimulálta a bél mesenchyma sejteinek proliferációját, cyclopamine kezelés hatására a submucosalis mesenchyma sejteinek osztódása jelentősen lecsökkent.

Megvizsgáltuk a kezelésekre apoptózisra kifejtett hatását is. Az anti-kaspáz 3 expressziós mintázata alapján nem fordul elő apoptózis az Shh vagy cyclopamine kezelt szervek bélidegrendszerében. Mindemellett a Shh növekedési faktor hatására kialakuló disztális utóbél aganglionózist a caecum szakaszáig megfigyelhető korai neuronális differenciáció kíséri. A csirke embrióból származó megfigyeléseinket egér embrionális béllal végzett kísérletekkel is alátámasztottuk.

4.1.2. A Shh bélidegrendszerre kifejtett hatása felveti annak a lehetőségét, hogy a morfogén receptora (Ptc1) a ganglionléc-eredetű sejtekben is kifejeződik

A Ptc1 *in situ* hibridizáció és a p75/HNK-1 immuncitokémia együttes alkalmazása sem csirke, sem egér embrióban nem igazolta a ganglionléc sejteken feltételezett koexpressziót. A Shh receptorok expressziójának entericus ganglionléc-eredetű sejteken megfigyelhető hiánya felveti annak a lehetőségét, hogy az Shh gátló hatása nem a bélidegrendszer sejtjein közvetlenül, hanem az entericus ganglionléc-eredetű sejteket fogadó mikro környezet módosításán keresztül érvényesül.

4.1.3. A Shh hatása a bél extracelluláris mátrix mintázatára

A Ptc1 receptor expressziójának ganglionléc-eredetű sejteken megfigyelt hiánya azt sugallja, hogy a Shh bélidegrendszer fejlődését gátló hatása csak közvetett módon, a mikro környezet megváltozásán keresztül érvényesülhet. Megvizsgáltuk, hogy a Shh milyen hatást fejt ki a bélcső mátrixfehérjéinek 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 legjelentősebb, Shh által indukált változást a gátló hatású kollagén IX, verszikán és CS-56 esetében figyeltük meg. Ezek a kondroitin-szulfát proteoglikánok családba tartozó fehérjék normál esetben a bélcső belső rétegében, a leendő submucosalis mesenchyma területén fejeződnek ki, viszont Shh kezelés hatására mind a kollagén IX mind a verszikán expressziója megnövekedett és a teljes bél falban egyenletesen kiterjedt expressziót mutatott. Ezzel ellentétben a Shh jelátvitel, cyclopamine-nel történő gátlása drasztikusan lecsökkentette ezen kondroitin-szulfát proteoglikán típusú mátrixfehérjék expresszióját, a verszikán és kollagén IX immunreakciója csupán a subepithelialis mesenchymalis régióra korlátozódott.

4.2. A ganglionléc-eredetű őssejtek mikro környezetét meghatározó ECM molekulák expressziós mintázatának szerepe a bélidegrendszer normál és patológiás fejlődésében

Látva az extracelluláris mátrix dinamikus változását kísérleti munkánk második részében részletesebben igyekeztünk karakterizálni a vándorló entericus ganglionléc-eredetű sejtek és az extracelluláris mikro környezet közötti kölcsönhatást. A különböző fejlődési stádiumok extracelluláris mátrix mintázatának immunhisztokémia összehasonlítása közben a heparán-szulfát proteoglikánok (kollagén XVIII, agrin)

entericus ganglionok körüli expressziós mintázatát figyeltük meg. A kollagén XVIII-nak és az agrinnak ez a specifikus, embrionális korban megfigyelhető periganglionáris expressziós mintázata posztnatális korban is megmarad. 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 és az agrin molekulák ganglionléc-eredetű sejtekhez köthető expressziója felveti a kérdést, hogy az entericus ganglionléc-eredetű sejtek szükségesek-e a HSPG fehérjék expressziójához.

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

Kísérletesen és genetikailag aganglionotikus (*Ednrb*^{-/-} null mutáns egerekből izoláltuk a ganglionmentes disztális vastagbelet) modellekből származó adatok egybehangzóan arra utalnak, hogy az entericus ganglionléc-eredetű sejtek jelenléte szükséges a kollagén XVIII és az agrin periganglionáris expressziójához.

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

A CAM tenyészetekből és a transzgenikus embriókból nyert *in vivo* eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy az agrint és a 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. Inkubálást követően a graftokból készült sorozatmetszetek immunfestése minden esetben azt mutatta, hogy a bélidegrendszer kizárólag csirke eredetű sejtekből származik. Az extracelluláris mátrix fehérjék eredetét szintén fajspecifikus ellenanyaggal igazoltuk. A testüregbe ültetett egér bélben a csirke-kollagén XVIII és csirke-agrin típusú extracelluláris mátrix a fejlődő enterális plexusok körül és intraganglionárisan jelenik meg. Ganglionléc-eredetű sejtek extracelluláris mátrix termelését célzó csirke embriómanipulációs kísérletek után Dr. Ryo Hotta (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School Boston) szívességéből rendelkezésünkre bocsájtott 3 hetes *Wnt1;tdT* egér béltraktusából előállított idegi sejtaggregátumokat (neurosphere) 5 napos csirke embrió caecalis régiójába ültettük és a rekombinálat szövetet

9 napos fogadó embrió chorioallantois membránján tenyésztettük. Csakúgy, mint csirke embrióban az egér eredetű entericus neuronális őssejtek is kollagén XVIII-at és agrint termelnek.

Annak meghatározására, hogy a posztnatális bélben később melyik bélidegrendszeri sejtípus képes heparán-szulfát proteoglikánokat 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 sejtaggregátumokat tenyésztettünk. a PLP1⁺ gliasejtek kollagén XVIII-at és agrint is expresszálnak, míg a Tau⁺ entericus neuronok csak agrint termelnek.

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

Munkánk során *in vitro* sejtmigrációs (stripe-choice assay) analízissel vizsgáltuk a két heparán-szulfát proteoglikán 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 extracelluláris mátrix 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. A kollagén XVIII bár támogatja az entericus ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását, jelenléte a Coll18a^{-/-} egér fenotípusa alapján nem esszenciális, hiányát feltehetőleg más permisszív hatású extracelluláris mátrix molekula képes kiküszöbölni. A két heparán-szulfát proteoglikán eltérő funkciója magyarázatul szolgálhat az expressziós mintázatukban megfigyelt időbeli eltérésére.

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. Wnt1;tdT egérből származó idegi sejtaggregátumok metszetein Sox10 és Phox2b koexpressziójuk alapján azonosítottuk a differenciálatlan, progenitor sejteket. Kimutattuk, hogy a kettősen pozitív sejtek nem expresszálnak agrint, 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.

5. 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 sejtváندorlást 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 extracelluláris mátrixot termelve, saját mikrokörnyezetük kialakításában is részt vesznek. A ganglionléc-eredetű sejtek extracelluláris mátrix termelő funkciójának ismerete elengedhetetlen a hatékony őssejt-terápiák kidolgozásakor.

6. PUBLIKÁCIÓS LISTA

6.1. 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*. 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*. doi:10.1242/dev.160317.

IF: 5,413

(*megosztott első szerzőség)

6.2. 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* 1–10. doi: 10.1111/joa.12863.

IF: 2,479