Nyúlvános CD45+ sejtek ontogenezise a madár embrióban és a bélidegrendszer ganglionjaiban

Doktori tézisek

Dr. Dóra Dávid László

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Nagy Nándor PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók:	Dr. Engelmann Péter PhD, egyetemi docens Dr. Jakus Zoltán PhD, egyetemi docens
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Kiss András DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Gócza Elen DSc, tudományos tanácsadó Dr. Krenács Tibor DSc, tudományos főmunkatárs

Budapest
2018

1. BEVEZETÉS

Az „optimális” fejlődésbiológiai modellek kiválasztásánál az embriológusok számára a legfontosabb szempont mindig a könnyű hozzáférhetőség, laboratóriumi fenntarthatóság, gyors embrionális fejlődés, kísérletes manipulálhatóság és a beavatkozásokkal szembeni ellenállóképesség volt. Az utóbbi években egyre nagyobb szerepet kaptak azok a madárembriókon végzett embriómanipulációs és sejtjelölési kísérletek, amelyekben nyomon követhető egy sejttípus eredete, vándorlása és differenciálódása. A viszonylag nagyméretű madár embrió lehetővé teszi a legváltozatosabb embriómanipulációs kísérleteket, melyekkel széleskörűen tanulmányozható a különböző őssejt típusok ontogenezise, differenciálódása, illetve a köztük fennálló interakciók az embrionális fejlődés folyamán. Ezen adottságai miatt a madár embrió jelentős mértékben hozzájárult a vérképzés megismeréséhez is.

A vérképző vagy hemopoietikus őssejtek (hematopoietic stem cells, HSCs) olyan multipotens sejtek, amelyek képesek mind a négy vérsejtvonal (eritroid, trombocitoid, mieloid, limfoid) populációinak létrehozására. A HSC-k azonosítása és karakterizálása a monoklonális ellenanyagok (mAb) bevezetésével kapott nagy lendületet. A CD45 egy membrán-asszociált protein tirozin-foszfatáz receptor (PTPRC), amit közös leukocita antigénnek (LCA) is hívnak. A CD45 nem csupán a differenciálatlan HSC-ken expresszálódik, hanem minden hemopoietikus elemen megtalálható. Az eritroid sejtvonalat kivéve, az embrióban az összes differenciálódó hemopoietikus elemet, beleértve a mononukleáris sejtvonalat (makrofág, monocita), polimorfonukleáris granulocitákat, trombocitákat, limfocitákat és dendritikus sejteket is jelöli.

Zebrahal, csirke és egér modellállatokon végzett kísérletek igazolták, hogy a gerinces embrióban zajló hematopoiesis a vérképző őssejteket (HSC) képezi, amelyek intenzív proliferáció, migráció és differenciálódás után a gerinces szervezet vérsejtjeit hozzák létre. Ez a folyamat anatómiailag elkülönült területeken történik: az extraembrionális mezodermában kezdődik (*primitív vérképzés*), majd az aorta dorsalis-ban, és a paraaortikus mesenchymában, illetve a magzati májban folytatódik (*definitív vérképzés*). A HSC-k végül a primer nyirokszerveket és a csontvelőt kolonizálják, ahol további HSC-k és differenciált előalakok képződnek. Habár a vérsejtek differenciálódására számos molekuláris biológiai adat áll rendelkezésünkre, a szikhólyagban képződő őssejtek ontogenezise csak részben ismert.

Ma már tudjuk, hogy a szikhólyag primitív HSC-inek döntő része eltűnik az embrionális fejlődés végén, mégis fontos áthidaló szerepük van a szövetek passzív diffúzióval történő táplálása és az intraaortikus vérképzés megjelenése között. Csirkében az embrionális fejlődés 2. napján és 3. napjának elején a szikhólyag primitív eritrocitái biztosítják a gasztrulálódó embrió oxigén-igényét az intra- és extraembrionális keringés összekapcsolódásától, az organogenezis kezdetéig. A madár embrióban, ahogy az egérben is, a primitív HSC az extraembrionális szikhólyag vérszigeteiben jelenik meg, és egy tranziens hemopoietikus populációt hoz létre, döntően eritroid és trombocitoid potenciállal. Bizonyos extraembrionális HSC-k viszont képesek arra, hogy kolonizálják az embrionális fejlődés korai szakaszaiban a szöveteket és ott rezidens, nyúlványos sejtekké differenciálódjanak. Az utóbbira példa a mikroglia és a Langerhans sejtek csoportja, melyek megtelepedésük után perzisztálnak a szövetekben és *in situ* önmegújulásra is képesek.

Doktori munkámban először mutattunk be egy olyan átfogó analízist, amely nyomon követi a CD45+ HSC embrionális megjelenését és kolonizációját, valamint a sejtek morfológiai jegyeit és immunfenotípusát részletesen leírja. A CD45+ sejtek embrionális karakterizálása során arra lettünk figyelmesek, hogy egy nyúlványos makrofág populáció a fejlődő bélcső mesenchymájában, közel a bélidegrendszer plexus myentericusának ganglionjaihoz fordul elő. Ez a megfigyelés felvetette annak a lehetőségét, hogy a felnőtt enterális ganglionokban a ganglionléc eredetű neuronok és gliasejteken kívül egy harmadik sejtpopuláció is létezik.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Madár embriókon végzett vizsgálatok mutatták meg először, hogy a magasabb rendű gerincesekben, így a humán embrióban is, a definitív vérképző őssejtek a dorzális aorta területén alakulnak ki és az itt fejlődő CD45+ progenitorok később az összes vérsejtvonal létrehozására képesek. Habár a vérsejtek differenciálódására számos molekuláris biológiai adat áll rendelkezésünkre, a korai embrióban zajló vérképzés fejlődésmechanizmusa csak részben ismert. Az elmúlt évtized vérképzést célzó kutatásai egyre inkább hangsúlyozzák az extraembrionális vérképzés fontosságát is. Szikhólyagi eredetű őssejtekből származnak az agy mikroglia és a bőr Langerhans sejtjei és számos makrofág típusú sejt szikhólyagi eredetét is feltételezik, de a szikhólyag eredetű sejtek pontos embrionális disszeminációja csak részben feltárt. Doktori munkám első felében ezekre a kérdésekre kerestem a választ, különös

figyelmet fordítva arra, hogy van-e ontogenetikai kapcsolat az intraembrionális mesenchymában előforduló nyúlványos CD45+ sejtek és a primer nyirokszervekben elődorduló makrofág és dendritikus sejtek között. Az embrionális és felnőtt madarak, illetve egér bélidegrendszerében megfigyeltük, hogy nyúlványos CD45+ sejtek a bélfal ganglionjaihoz asszociáltan, valamint a gangliont alkotó neuronok és gliasejtek között is előfordulnak. Továbbá, komparatív vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az intraganglionáris nyúlványos CD45+ sejtek mikrogliára jellemző sejtfelszíni molekulákat expresszálnak. Vajon az idegsejteken és a glián kívül létezik-e az enterális idegrendszerben is egy mikrogliának megfeleltethető harmadik elem? Doktori munkám második felében ennek az intraganglionárisan megjelenő CD45+ sejttípusnak az immunológiai fenotípusát és embrionális fejlődését vizsgáltam.

A kutatásom céljai a következők voltak:

1. CD45+ sejtek azonosítása az intra- és extraembrionális szövetekben, immunológiai karakterizálásuk és szöveti eloszlásuk feltérképezése a korai csirke embrióban.

2. CD45+ sejtek intraembrionális differenciálódásának nyomonkövetése.

3. Az organogenezis végén az embrionális szövetekben fennmaradó, nyúlványos morfológiájú CD45+ sejtek származásának meghatározása embrionális kiméra technikával. Vajon a bursa Fabricii dendritikus sejtjei származhatnak-e a nyúlványos CD45+ sejtpopulációból?

4. A bélfal ganglion-asszociált CD45+ sejtjének immunológiai karakterizálása és ontogenezisének tanulmányozása embriomanipulációs módszerrel.

3. MÓDSZEREK

3.1 Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez csirke (Gallus gallus, White Leghorn SPF, Phylaxia Sanophi, Magyarország), és fürj (Coturnix coturnix japonica) embriókat, valamint izolált embrionális szerveket használtunk fel. A transzgenikus GFP-t (green fluorescent protein) expresszáló és $CSF1R^{GFP}$ (minden CSF1-receptort kifejező makrofág zöld fluoreszenciát mutat) csirketojásokat Professzor Helen Sang és Dr. Adam Balic jóvoltából a skóciai Roslin Intézetből (University of Edinburgh) kaptuk. A $CX3CR1^{GFP}$ (minden mikroglia és intesztinális makrofág zöld fluorescens proteint expresszál) transzgenikus egereket Prof. Allan Goldstein (Harvard Medical School) laboratóriumának közreműködésével szereztük be.

3.2 A minták szövettani feldolgozása

Hisztológiai vizsgálatokra korai (10 napnál fiatalabb) csirke embriókat, a hozzájuk tartozó szikhólyagot, embrionális szerveket (lép, bursa fabricii, szív, bél, tüdő, máj, tímusztelep), valamint 4-12 hetes csirke vékony- és vastagbelét, illetve 8 hetes egér vékony- és vastagbelét használtuk fel. Az immuncitokémiai és immunfluoreszens vizsgálatokhoz zselatinos fagyasztott blokk készült. A kivett szerveket méretüktől függően 1-2 órán, vagy egy éjszakán át fixáltuk pufferelt 4% paraformaldehidben (PFA), majd foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) háromszor 5 percig mostuk. A szerveket a fixálást követően, egy éjszakát 15%-os szacharóz PBS oldatában inkubáltuk 4ºC-on, majd a beágyazást megelőzően 37ºC-on, 1 órán keresztül, 15% szacharózt és 7,5% zselatint tartalmazó PBS oldatban tartottuk. A blokkokat folyékony nitrogénnel -50ºC-ra lehűtött 2-metilbután–izopentánban 1 perc alatt lefagyasztottuk, és felhasználásig -80ºC-on tároltuk. A metszésre Shandon gyártmányú kriotomot (kriosztát) használtunk és a zselatinos blokkokat -27ºC-os, munkahőmérsékleten metszettük. A mintákból 11-12 µm vastag metszeteket készítettünk a kloronaftolos és immunfluoreszcens fénymikroszkópos feldolgozáshoz; 20-25 µm vastag metszeteket pedig konfokális mikroszkópiához.

3.3 Immunhisztokémia és immunfluoreszcencia, metszetek fényképezése, feldolgozása

A fagyasztott metszeteket PBS-ben 10 percig rehidráltuk szobahőmérsékleten, ezt követően rájuk mértük a primer ellenanyagot (50-80 µl/metszet), majd 60 percig szobahőmérsékleten, nedves kamrában inkubáltuk. Szekunder ellenanyagként, biotinnal konjugált lóban termelt anti-egér IgG-t, anti-kecske IgG-t, illetve anti-nyúl IgG-t használtunk, amellyel további 45

percig inkubáltuk szobahőmérsékleten a metszeteket. A szöveti endogén peroxidázok aktivitásának blokkolására a metszeteket PBS-sel 3%-ra hígított H_2O_2-ba helyeztük 10 percre. A mosás után ABC komplexet (avidin-biotin-peroxidáz komplex) vittünk fel a metszetekre és további fél órát inkubáltuk őket. Végül a kötődött peroxidáz enzim aktivitását 4-chloro-1-naftollal detektáltuk. Immunofluoreszcens festések alkalmával a metszetek előkészítését és primer ellenanyaggal való inkubálását, az immunhisztokémiai fejezetben leírtakkal azonos módon végeztük. Ezt követően, fluorokrómmal konjugáltatott szekunder ellenanyagot (50-80µl/ metszet) mértünk a metszetekre. A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6 diamino-2-phenylindole, dihydrochloride) reagenst használtunk. Néhány esetben a mikroszkópos vizsgálatokat nem metszeteken, hanem béldarabok körkörös simaizom rétegének teljes szöveti festésén (whole mount technika) végeztük, amely tartalmazta a plexus myentericust is (LMMP preparátum). 8 hetes felnőtt egerek béltraktusából kipreparált ileum és colon szakaszok mucosáját és longitudinális simaizom rétegét eltávolítottuk, majd a megmaradt circularis simaizom réteget kiterítettük, és 3x5 percig PBS-ben mostuk. PFA fixálás után a primer ellenanyagból (humán anti-Hu és anti-GFP) 300µl-t mértünk a béldarabra, 4ºC-on inkubáltuk, majd Alexa konjugált egér anti-humán (A594) és szamár anti-kecske (A488) szekunder ellenanyaggal hívtuk elő a fluoreszcens jelet. A metszeteket Zeiss Axiophot mikroszkóppal tekintettük át, és Zeiss AxioCam HCR kamera segítségével, digitális képeket készítettem különböző nagyításokon. A konfokális mikroszkópiát Zeiss LSM 710 típusú mikroszkóppal végeztem. A képek további feldolgozásához, szerkesztéséhez ImageJ és Adobe Photoshop CS 7.01 típusú programokat használtam.

3.4 Embriómentes szikhólyag *in ovo* tenyésztése

Annak eldöntésére, hogy összekapcsolódott-e már a csirke embrió intra- és extraembrionális keringése, egy 50 µl-es Hamilton fecskendővel felszerelt Narishige mikroinjektort használtunk, amivel 33 óra és 50 óra közötti stádiumok közötti embriók szívcsövébe 2 µl 1:10 arányban PBS-ben higított Pelikan tust injektáltunk. Az *in ovo* szikhólyag-tenyészetekhez 33 órás stádiumú embriókat használtunk, ugyanis ez volt a legkésőbbi olyan stádium, amikor még nem volt anasztomózis a szikhólyag és az embrió keringése között. Az embriópajzsból az embriókat Moria Pascheff-Wolff Spring ollóval távolítottuk el és az embrió-abláció után maradt szikhólyag szabadon maradt lemezeit, iridotómiás ollóval finoman összetapasztottuk. A 72 órás inkubáció végén 10×10 mm-es darabokat vágtunk a tenyésztett szik preparátumokból, majd 4%-os PFA-ba fixáltuk őket 2 órán át.

3.5 Csirke – fürj parabiózis

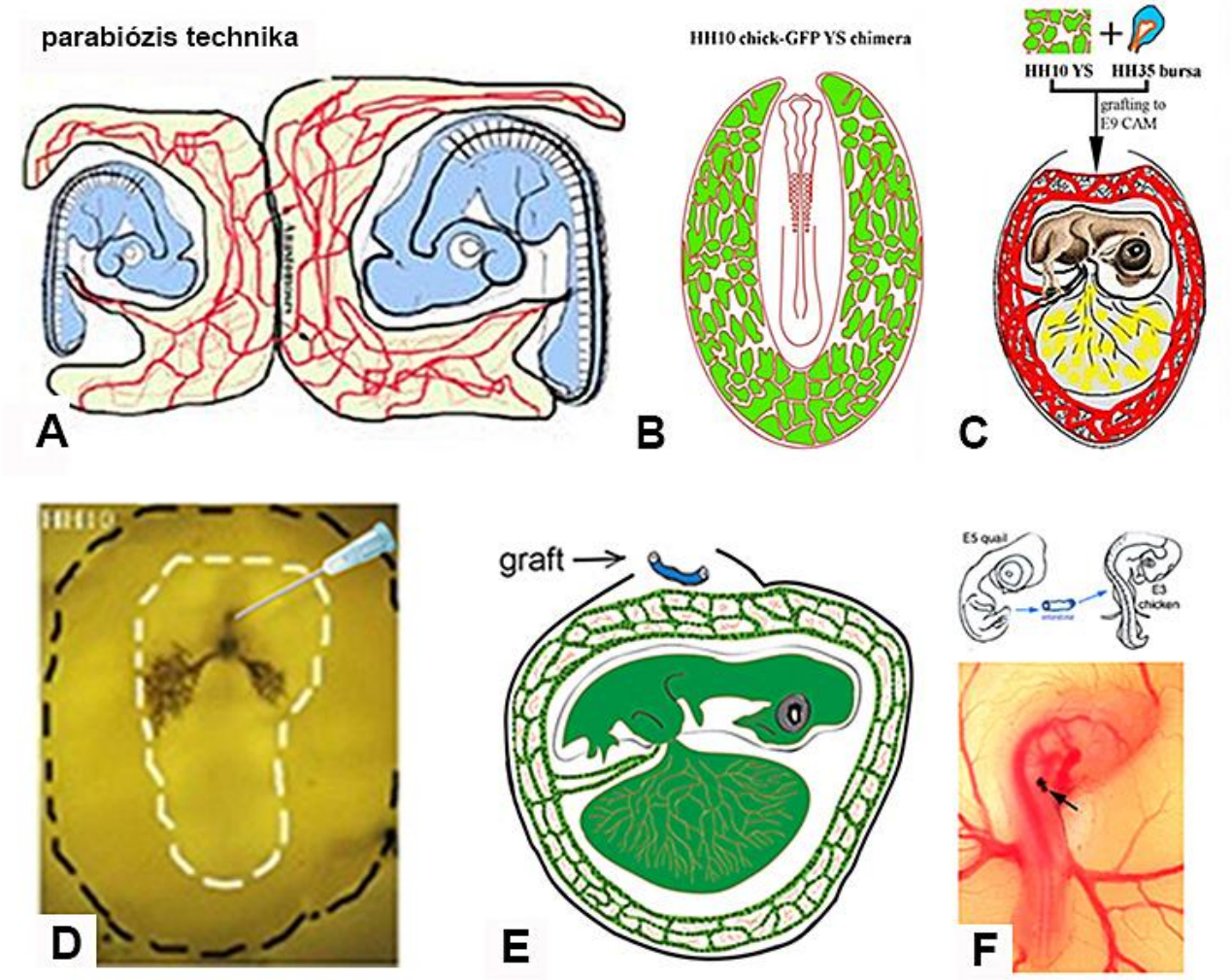
A csirke - fürj parabiózis technika alkalmas arra, hogy meghatározzuk a keringésben lévő CD45+ sejtek fejlődési képességét, illetve azt, hogy az embrió mesenchymájában található nyúlványos CD45+ sejtek származhatnak-e a keringés kerek morfológiájú CD45+ vérképző sejtjeiből. A kísérlet során a 24 órát inkubált csirketojásokban a csirke embriópajzsot úgy orientáltuk, hogy az minél nagyobb felületen érintkezzen a fürjtojásból mellé öntött fürj embriópajzzsal. A tojásokat 38ºC-on inkubáltuk tovább a laboratóriumi keltetőgépben. A 12 inkubált parabiotikus embrió-párból 3 nap után 7 volt életben, 5 nap után 3, 7 nap után pedig 2 parabiont-pár maradt meg, ami kísérlet végére 17%-os túlélési arányt jelentett.

3.6 Szikhólyag kiméra

Az extraembrionális eredetű őssejtek kísérletes nyomon követésére szikhólyag kimérákat készítettünk, melyekhez White leghorn (WT) és transzgenikus GFP (green fluorescent protein) csirke tojásokat használtunk 33 órás stádiumig. Az embriópajzs központi területéről a HH10 stádiumú GFP-csirke embriót kimetszettük, és helyére azonos stádiumú normál WT csirke embriót implantáltunk. A fogadó szikhólyag és a donor embrió összetapadását a szabad szélek Pascheff-féle iridektómiás ollóval végzett vizszíntes bevágásával lehet összekapcsolni. Az embriomanipuláció után a tojásokat lefedtük (n=32) és további 72 órán át inkubáltuk, ami alatt vaszkuláris anasztomózisok létesültek a „varrat”-on keresztül és GFP+ szikhólyag eredetű sejtek kolonizálták az embriót. A szikhólyag kimérákat 5 napos stádiumban (n=6) fixáltuk 4%-os PFA-ban, majd szövettani feldolgozásra és fluoreszens immuncitokémiára kerültek. A 32 inkubált kimérából 6 élte túl a 72 órás inkubálást, ami 19%-os kísérleti túlélést jelent.

3.7 Csirke-fürj testüreg kiméra

A kísérlet során a fogadó 3 napos csirke embriókat a héjhártya és az amnion megnyitásával tettük szabaddá. Ezután a donor fürj embriót kiemeltük a tojásból, ventralis részén az ektodermát megnyitottuk, majd finom csipeszek segítségével kipreparált béldarabokat pipetta segítségével a már előkészített fogadó embrió testüregébe helyeztük és a szív mögé fordítva megfelelően orientáltuk. A transzplantációt követően a tojást átlátszó ragasztószalaggal lezártuk és az embriókat 14 napig inkubáltuk. Összesen 8 transzplantációból 6 volt sikeres (75%), melyeket szövettanilag is feldolgoztunk.



1. ábra. Kísérletes munkám során alkalmazott embriomanipulációs módszerek sematikus ábrái. **A)** csirke-fürj parabiózis technika **B)** GFP szikhólyag-kiméra **C)** *in vitro* bursa Fabricii – GFP szikhólyag rekombináció és CAM tenyészet **D)** *in ovo* tus-feltöltés és szikhólyag tenyészet **E)** embrionális bél graft GFP-CAM tenyészete **F)** csirke-fürj testüreg kiméra

3.8 Bursa fabricii- szikhólyag rekombináció

Annak érdekében, hogy követni tudjuk a szikhólyag eredetű CD45+ sejteket az 5. embrionális nap után is 9 napos bursa Fabricii-t kombináltunk embrió abláción átesett *in ovo* tenyésztett szikhólyag fragmentumokkal. A normál embrióból származó bursákat, GFP csirkéből származó szikhólyag darabkákba csomagoltuk, majd a „szikhólyag-boríték" két szabad szélét iridotomiás ollóval összetapasztottuk. Az így keletkezett GFP szikhólyag – vad típusú bursa Fabricii rekombinált graftokat 9 napos, normál csirke embrió chorioallantois membránjára (CAM) implantáltuk. A graftokat (n=24) 7 napig tenyésztettük tovább, majd 4% PFA-ban fixáltuk 1 órán keresztül. A 24 kimérából 18 élt túl (75%).

3.9 Embrionális bélszakaszok chorioallantois membrán (CAM) tenyésztése

A bélidegrendszer intraganglionáris makrofágjainak hemopoietikus eredetének tanulmányozására 8 napos normál csirke közép- és utóbél szakaszokat transzplantáltunk 9 napos green fluorescent protein (GFP) csirke embriók CAM-jára, majd 9 napig tovább tenyésztettük őket (n=22). A CAM graftok 70%-a élt túl a 9 napos inkubáció után.

4. EREDMÉNYEK

4.1 CD45+ sejtek megjelenése és differenciálódása a korai csirke embrióban

A csirke embrió fejlődése során az első CD45 expressziót mutató sejtek 50 órás stádiumban jelennek meg és két különböző fenotípust mutatnak: a kerek morfológiájúak a vérszigetek lumenében, a nyúlványosak a vérszigetek közötti mesenchymában fordulnak elő. Megfigyeltük, hogy 56 órás stádiumtól mind a szikhólyagi vérszigetekben, mind az embrió ereiben a CD45+ sejtek egy kisebb szubpopulációja CD51/61 trombocita markert expresszál. A keringésben található sejtek mellett ebben a stádiumban figyelhető meg először intraembrionálisan nyúlványos CD45+ sejt, amely koncentráltan a cranialis mesenchymában a neuroepitélium közelében fordul elő. Ezek a sejtek, hasonlóan a szikhólyag vérszigetei között megjelenő első CD45+ sejtekhez vékony, csillag alakú citoplazmával és hosszú nyúlványokkal rendelkeznek. A nyúlványos CD45+ sejtek pár órával később (64 órás stádium) az embrió törzsi mesenchymáját is benépesítik, miközben a kerek CD45+ sejtek az dorzális aorta ventrális falához tapadva az intraaortikus redőket alakítják ki. A nyúlványos CD45+ sejtpopuláció 12-24 órával korábban jelenik meg, mint az aortai vérképzés, ami arra utal, hogy nem a kerek sejtek prekurzoraitól származik.

Az 5 napos csirke embrióban a növekvő számú nyúlványos CD45+ sejtek szétszóródnak a gerinchúr és a velőcső körül, belépnek a felszíni-, illetve a neurális ektodermába, de megjelennek a fejlődő májban, pancreasban, szívben, bélcsőben, illetve a végtagbimbók mesenchymájában is. Egyre több nyúlványos CD45+ sejt mutat MHCII koexpressziót. A nyúlványos mellett egy amőboid morfológiát mutató CD45+ sejtpopuláció is megjelenik, mely a LAMP1 lizoszóma-marker (Lep100) kolokalizációját mutatja. A CD45+ Lep100+ sejtek makrofág fenotípusát savas foszfatáz hisztokémiával is bizonyítottuk. Ez a sejtpopuláció morfológiailag és immunológiailag jól elkülöníthető a CD45+MHCII+ vagy CD45+MHCII- nyúlványos sejtektől. CD45 immunpozitivitás a paraaortikus régió területén

először a 6 napos csirke embrió keresztmetszetén látható, ahol nagy számú kerek CD45+ sejt jelenik meg a dorzális mezentérium területén, az aortától és a nyelőcsőtől caudálisan, a mesonephros telepéig terjedve. Miközben a paraaortikus régió CD45+ sejtjeinek immunofenotípizálását végeztük, a mesonephros telepétől caudálisan, az embrionális arteria coeliaca körül egy teljes „hemopoietikus hüvelyt" fedeztünk fel, melyet kerek CD45+ sejtek aggregátumai alkotnak. A „periarterialis hemopoietikus" gyűrű a 6. embrionális napon jelenik meg és a 9. embrionális napig van jelen az aorta páratlan zsigeri ágai körül.

Az embrionális fejlődés 8. napjára a CD45+ sejtek benépesítik az összes embrionális szövetet, beleértve a neuroepitéliumot is. Erősen nyúlványos CD45+ sejtek az epidermiszben is feltűnnek, amelyek Langerhans sejtek előalakjai lehetnek. A velőcső körül előforduló nyúlványos CD45+ sejtek egy része MHCII molekulát expresszál, viszont negatív a Lep100 klasszikus makrofág markerre. Ebben a stádiumban az amőboid alakú fagocita sejtek főleg az aorta körüli mesenchymában, a bélfalban és a végtagok interdigitális régióiban figyelhetőek meg és savas-foszfatáz enzim aktivitás jellemzi őket. A 8. és 10. embrionális nap között a nyúlványos CD45+ sejtek száma folyamatosan növekszik. Ebben az időszakban, a megjelenő limfomieloid szervek (lép, tímusz, bursa Fabricii) is kolonizálódnak CD45+ sejtekkel. Madárban a B-sejt érés elsődleges szerve a bursa Fabricii (BF). A BF kezdemény a cloaca ektodermális részének egy epiteliális divertikulumából fejlődik ki. Az első CD45+ sejtek a 8 napos embrióban jelennek meg elszórva a BF mesenchymájában, és egy részük kerek, míg egy másik sejtcsoport nyúlványos morfológiát mutat. A 10 napos bursában 3 féle CD45+ sejtpopuláció írható le: 1) kis számú CD45+chB6+ kerek, B-sejt előalak; 2) CD45+Lep100+ amőboid granulociták aggregátumai koncentráltan a BF proximális mesenchymájában; 3) CD45+MHCII+ sejtek, melyek nyúlványos morfológiát mutatnak és a bursa epitéliuma alatt csoportosulnak.

4.2 CD45+ sejtek nyomon követése a keringésben parabiózis technikával

A hemopoietikus sejtek korai differenciálódásának vizsgálata után arra kerestük a választ, hogy mi a kerek és nyúlványos hemopoietikus sejtek egymáshoz való viszonya? Ahhoz hogy megállapítsuk, hogy a szöveti, nyúlványos CD45+ sejtek származhatnak – e a keringésben előforduló kerek morfológiájú CD45+ sejtektől, embrionális csirke – fürj parabiózis módszert alkalmaztuk. A csirke parabiontból származó hemopoietikus sejteket a CD45, a fürj eredetű HSC-ket és endotél sejteket a QH1 marker alapján különítettük el a fogadó embrióban. Az immunfluoreszens festésekből kapott eredmények alapján a fürj embrió szöveteiben csak a

kerek morfológiát mutató, CD45+ HSC-k fordultak elő, nyúlványos sejteket nem találtunk. Csirke-fürj parabiotikus kimérák immuncitokémiai vizsgálata azt mutatta, hogy csak a kerek sejtek keveredtek az embriókban, míg a nyúlványosok a közös keringés ellenére sem kolonizálták kölcsönösen a szervek mesenchymáját. Ez a kísérletes eredmény felveti annak a lehetőségét, hogy az embriókban a kerek és nyúlványos sejtvonal már a keringés megindulása előtt szétválik és a kerek-sejtes forma nem prekurzora a nyúlványosnak.

4.3 Szikhólyag eredetű nyúlványos CD45+ sejtek kolonizálják az embrionális szöveteket

Jelenlegi ismereteink alapján a szikhólyagi hemopoietikus sejtek sokféle sejtté differenciálódhatnak, ezért feltételeztük, hogy az intraembrionálisan előforduló CD45+MHCII+ nyúlványos sejttípus a korai szikhólyagban megjelent, hasonló morfológiájú, CD45+ sejtektől származik. Ennek bizonyítására, 33 órás csirke embriók ablációja után *in ovo* szikhólyag tenyészeteket készítettünk. A tenyészetek viabilitásának vizsgálata után CD45 immunfestést alkalmaztunk, ahol a a vérszigetek lumenén előforduló kerek CD45+ sejtek mellett MHCII-t koexpresszáló, nyúlványos CD45+ sejteket azonosítottunk a vérszigetek közötti mesenchymában. Ahhoz, hogy az intraembrionális nyúlványos CD45+ sejtek szikhólyagi eredetét más módszerrel bizonyítani tudjuk, szikhólyag-kimérákat készítettünk. Az kisérletben 40 órás stádiumú GFP csirke embriópajzsból eltávolítottuk az embriót, majd hasonló korú, normál embrióval helyettesítettük. A feldolgozott kimérákban a GFP-pozitív szikhólyagi sejtek teljesen kolonizálták az embrionális graftokat és erős CD45 koexpressziót mutattak. A GFP+ sejtek mindenütt megjelentek az embrionális mesenchymában és a neuroepitéliumban. Minden zöld GFP-vel jelölődő sejt kifejezte a CD45 hemopoietikus markert és hasonló eloszlási mintázatot mutatott, mint a normál embriókban. Ezzel szemben az intraembrionális eredetű intraaortikus redők kerek CD45+ sejtjei nem mutattak GFP-pozitivitást.

4.4 A bursa Fabricii dendritikus sejtjei a szikhólyagból származnak

Abból a célból, hogy a GFP alapú sorstérképezést érettebb szövetekre, például kifejlődött nyirokszervekre is ki tudjuk terjeszteni, egy alternatív technikát alkalmaztunk, melyhez 33 órás stádiumú GFP+ szikhólyag fragmentumokat kombináltunk 9 napos normál bursa Fabricii-kel, majd további 7 napig normál csirke embriók CAM-ján tenyésztettük őket. 9 nap tenyésztés után jól azonosítható CD45+ follikulusok jöttek létre a bursák parenchymájában. A follikulusokat donor-eredetű GFP+ sejtek kolonizálták, és az interfollikuláris területen is számos GFP+CD45+MHCII+ sejt jelent meg. A follikulusokon belül lokalizálódó GFP+

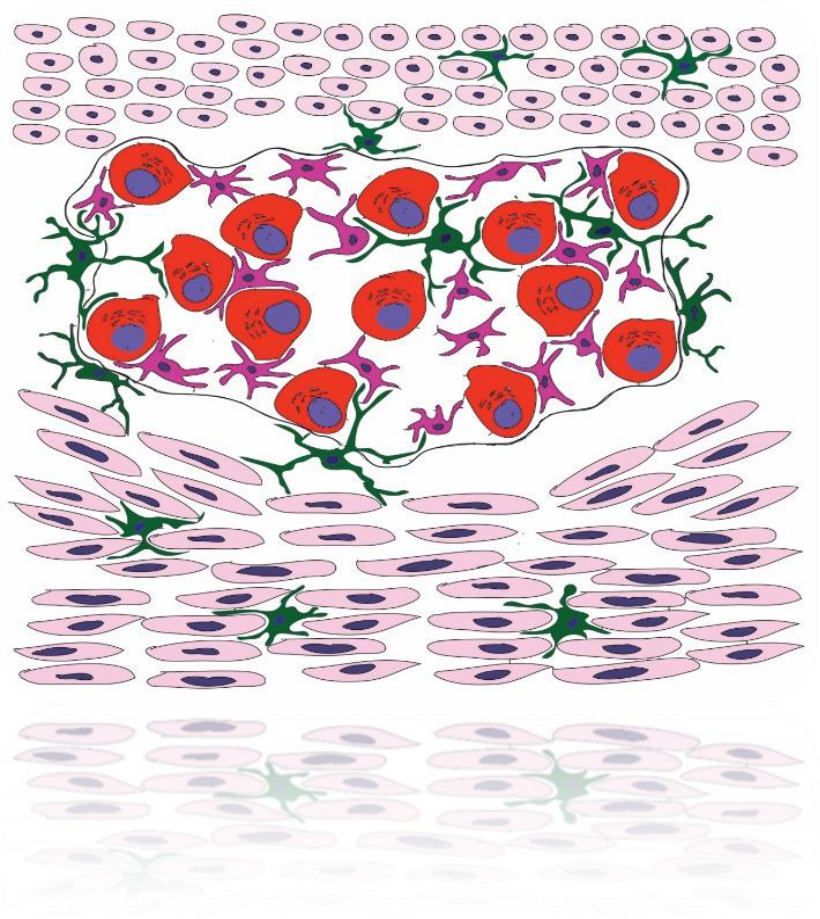
sejtek nyúlványos morfológiát mutattak és mindegyikük CD45-öt expresszált. Mikor megnéztük, hogy a GFP+CD45+MHCII+ nyúlványos sejtek pozitivak-e a csirke dendritikus sejteket jelölő 74.3 antitestre, azt tapasztaltuk, hogy az összes follikularis donor-eredetű sejt expresszálja a 74.3-at. Eredményeink felvetik azt a lehetőséget, hogy a mikroglia és a Langerhans sejteken kívül, a primer nyirokszervekben található dendritikus sejtek egy csoportja is az embrionális fejlődés korai stádiumában bevándorolt szikhólyagi prekurzorokból differenciálódik, és nem pedig csontvelői eredetű monocitákból.

4.5 Hemopoietikus eredetű sejtek a csirke és egér bélidegrendszer ganglionjaiban

A CD45+ sejtek embrionális karakterizálása során arra lettünk figyelmesek, hogy egy nyúlványos makrofág populáció a fejlődő bélcső mesenchymájában, közel a bélidegrendszer plexus myentericusának ganglionjaihoz fordul elő. A 18 napos csirke embrióban végzett immunfluoreszens festések azt mutatták, hogy ezek a nyúlványos CD45+ sejtek egy része a myenterikus és submucosus plexus ganglionjain belül helyezkedik el és megtalálható a madár-specifikus Remak ganglionban is. Ahhoz, hogy az újonnan azonosított sejtpopuláció hemopoietikus eredetét bebizonyítsuk, 8 napos embrionális vastagbél szakaszokat 9 napos GFP-t expresszáló embriók CAM-ján 9 napig tenyésztettünk. A GFP+ sejtek a graftot teljes mértékben kolonizálták, beleértve a bélfal ganglionjait és a Remak ganglion-t is. Az intraganglionáris sejtek hemopoietikus eredetüknek megfelelően CD45-öt expresszáltak, amelyet csirke-fürj testüreg kimérákkal is megmutattunk. Az embrionális kiméra kisérletekből kiderül, hogy az intraganglionáris nyúlványos CD45+ sejtpopuláció a vérből származik, és nem dúcléc eredetű, ami az enterális neuronokat és gliát hozza létre. Az intraganglionáris nyúlványos CD45+ sejtek MHCII-t, CSF1R-t (kolónia stimuláló faktor 1 receptor) és chB6 antigént fejeznek ki. A chB6 a madár limfomieloid szervekben előforduló B-sejtek markere de kifejeződik a tobozmirigy és a belső fül érzékhámjának mikroglia sejtjein is. A fehérje funkciója még nem teljesen ismert, de egyes kutatások szerint szerepe lehet a B sejtek túlélésében, apoptózisában és adhéziójában is. A bél mucosa rétegének B sejtjeivel ellentétben az intraganglionáris makrofágok nem fejeznek ki más B-sejt markereket, mint az EIVE-12 vagy a CD1, ami arra utal, hogy ezek a sejtek nem B limfociták. Az ismeretlen citoplazmatikus molekulát jelölő 74.2 más madár szöveti makrofág ellenes antitestekhez, mint a Lep100, vagy a KUL-01 (MRC1-mannóz receptor 1) hasonlóan, csak a ganglionokon kívül található myenterikus makrofágokat jelöli, az intraganglionárisakat nem. Transzgenikus $CSF1R^{GFP}$ reporter csirkék kisagyából, vékony- és vastagbeléből származó fagyasztott metszeteken végzett komparatív immuncitokémiai vizsgálatok segítségével, egy új

intraganglionáris makrofág populációt sikerült azonosítani. Megállapítottuk, hogy a központi idegrendszeri mikrogliához hasonlóan erre a sejtpopulációra is a CSF1R/chB6 antigének expressziója és a nyúlványos morfológia jellemző.

Annak meghatározására, hogy a csirkében megfigyelt intraganglionáris makrofág populáció az emlősök bélidegrendszerében is megtalálható-e, CX3CR1^{GFP} transzgenikus egereket használtunk. A CX3CR1 a fraktalkin nevű kemokin receptora, melynek szerepét először limfociták és monociták túlélésében, migrációjában és adhéziójában mutatták ki. A fraktalkin receptor (CX3CR1) azon kevés molekuláris marker közé tartozik, amelyek egyedülállóan jellemzőek az intesztinális makrofágokra és mikrogliára, más szöveti makrofágok azonban nem expresszálják. Vizsgálataink azt mutatták, hogy CX3CR1+ makrofágok megtalálhatók a vékony- és vastagbél muszkuláris rétegeiben és a myenterikus ganglionjai közelében. Részletes konfokális mikroszkópos analízissel kimutattuk, hogy a CX3CR1+ sejtek az intraganglionáris térben is előfordulnak, ahol nyúlványaikkal körbefonják az enterális neuronokat. Összefoglalva, eredményeink azt mutatják, hogy a muszkularis makrofágokkal mutatott morfológiai hasonlóság mellett az intraganglionáris makrofágok mikrogliára emlékeztető sejtfelszíni molekulákat expresszálnak.



2. ábra. Az egér és csirke enterális ganglion sematikus illusztrációja

piros:
enterális neuron
magenta:
enterális glia
pink:
sima izom sejt
zöld:
intraganglionáris
(CD45+MHCII+CSF1R+chB6+)^{csirke} és
extraganglionáris
(CD45+MHCII+CSF1R+KUL01+
74.2+)^{csirke} muszkuláris makrofágok

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kimutattuk, hogy extraembrionálisan kétféle CD45+ sejt differenciálódik. A kerek morfológiájú CD45+ sejtek a vérszigetek lumenében, a nyúlványos sejtek az extraembrionális mesenchymában jelennek meg. Későbbiekben a kerek sejtek az aorta, és annak zsigeri ágai körül lokalizálódnak, a nyúlványos morfológiájú sejtek elszórtan az embrionális mesenchymában találhatók.

2. Az irodalomban ismert intraaortikus redők és paraaortikus régión kívül, egy eddig ismeretlen vérképző területet azonosítottunk a hasi aorta páratlan zsigeri ágai körül, melyet „periarteriális hemopoietikus hüvelynek" neveztünk el. B-sejt specifikus immunfestések alapján feltételezzük, hogy ezen a helyen veszi kezdetét a csirke B-sejt prekurzorok differenciálódása.

3. Új embriomanipulációs módszert dolgoztunk ki a szikhólyag tenyésztésére. Parabiózis, *in ovo* szikhólyag tenyészet és szikhólyag kiméra technikák immuncitokémiai analízissel történő kombinálásával igazoltuk, hogy a CD45+ nyúlványos sejtek prekurzorai a szikhólyagban keletkeznek és az embrióba vándorolva kolonizálják a szervkezdeményeket, ahol MHCII-t expresszáló dendritikus vagy „stellate" sejtekké differenciálódnak.

4. Embrionális bursa Fabricii - szikhólyag rekombinációval és chorioallantois membrán tenyésztéssel bemutattuk, hogy a bursai dendritikus sejtek (BSDC-k) a szikhólyagból származnak.

5. Csirke embriókkal végzett embriomanipulációs kísérletekkel igazoltuk, hogy véreredetű CD45+ sejtek a fejlődő enterális ganglionokat is kolonizálják, amelyek letelepedésük után nyúlványos sejtekké differenciálódnak és a központi idegrendszerben található mikrogliához hasonló molekulákat expresszálnak.

6. Kimutattuk, hogy az intraganglionáris és ganglionon kívüli nyúlványos sejtek immunfenotípusa eltér egymástól. A CD45, MHC-II, és CSF1R sejtfelszíni molekulák mindkét sejttípuson előfordulnak, míg a B-sejtekre és mikrogliára specifikus chB6 molekula expressziója csak az intraganglionáris sejtekre jellemző. Ezzel szemben a 74.2, Lep100 és KUL-01 monocita eredetű szöveti makrofág markereket csak az extra-ganglionáris nyúlványos sejtek fejezik ki.

6. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

6.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Dora, D., Fejszák, N., Goldstein, A.M., Minkó, K., Nagy, N., 2017. Ontogeny of ramified CD45 cells in chicken embryo and their contribution to bursal secretory dendritic cells. Cell and Tissue Research 368, 353–370. doi:10.1007/s00441-017-2595-y

IF: 3,043

Dora, D., Arciero, E., Hotta, R., Barad, C., Bhave, S., Kovacs, T., Balic, A., Goldstein, A.M., Nagy, N., 2018. Intraganglionic macrophages: A new population of cells in the enteric ganglia. Journal of Anatomy. doi:10.1111/joa.12863

IF: 2,479

6.2 A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:

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., n.d. . Development. doi:10.1242/dev.160317

IF: 5,413