

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Az extracelluláris mikrokörnyezet szerepe a vastagbél idegrendszerének embryonális fejlődésében.

Dr. Nagy Nándor



**Semmelweis Egyetem,
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet,
Budapest
- 2020 -**

I. Bevezetés.

A bélidegrendszer a bélfalban található neuronokból és gliasejtekből álló komplex és kiterjedt hálózat, amely kritikus fontossággal bír a tápanyagtranszport, emésztés, felszívódás és a salakanyagok kiürítését biztosító bélmotilitás szabályozásában. A bélidegrendszert megközelítőleg 100 millió idegsejt alkotja, működése nagymértékben független a központi idegrendszertől, amiért rendszeresen „második agynak” is szokták nevezni. A veleszületett bélidegrendszer-rendellenességek széles spektruma tartozik a gasztrointesztinális traktust érintő abnormalitások közé. Ide soroljuk a congenitális neurointesztinális diszpláziákat, ganglioneuromatózist, valamint a Hirschsprung-kórt is (congenitum megacolon, ami 5000 élve születésből 1 esetben fordul elő). Mindegyik betegségnek a hátterében a ganglionléc eredetű őssejtek bélben történő vándorlásának, differenciálódásának rendellenessége áll, ez pedig ectopicus helyzetű ganglionokat, változó hosszúságú intesztinális aganglionózist okoz, amit súlyos motilitási zavar kísér. A Hirschsprung-kór jelenlegi kezelése a ganglionmentes vastagbél sebészi eltávolításából áll, azonban később sok gyermeknél rendellenes bélmozgás, következményesen konstipáció és enterocolitis alakul ki.

Az elmúlt évtizedben végzett őssejtkutatások többször felvetették annak a lehetőségét, hogy a bélbiopsziákból izolált szöveti őssejteket Hirschsprung-kórban szenvedő gyermekek gyógyítására alkalmazzák. Ebben a törekvésben mi is aktívan részt veszünk. Amerikai, svájci és izraeli kutatócsoportokkal együttműködve nemrég egy új eljárást dolgoztunk ki foetális humán béltraktus in vivo tenyésztésére, ami alkalmas módszer lehet az embryonális és felnőtt eredetű szöveti őssejtek fejlődésének tanulmányozására. Egy másik kísérletben, amikor humán posztnatális bélbiopsziákból izolált idegi őssejteket korai embryoba vagy ganglionmentes vastagbélbe transzplantáltuk, a beültetett őssejtek vándorlása folytatódott és idegi irányú differenciálódást mutatott.

Napjainkban az őssejtkutatás és a kísérletes embryológia (fejlődésbiológia) robbanásszerű fejlődése tapasztalható; más tudományágak kísérleti módszereit, eredményeit felhasználva, az egyedfejlődés során végbemenő folyamatok egyre mélyebb - sejt, illetve molekuláris szintű - megismerését eredményezi. Kiemelt szerepet kaptak azok a gerinces modellállatokon végzett embryomanipulációs és sejtjelölési kísérletek, amelyekben nyomon követhető egy sejtípus eredete, vándorlása és differenciálódása. A bélidegrendszert létrehozó ganglionléc-eredetű őssejtek tanulmányozása a veleszületett neurointesztinális betegségek patológiai hátterének karakterizálásán túl, a posztnatálisan kinyert szöveti őssejtek terápiás bevezetése szempontjából is kiemelt jelentőséggel bír.

Kutatócsoportom azt tűzte ki célul, hogy karakterizálja a bélidegrendszer embryonális fejlődését, meghatározza azokat az alapvető őssejt-mikrokörnyezet kölcsönhatásokat, amelyek hibája Hirschsprung-kórt eredményez, és hatékony őssejttranszplantációs módszert dolgozzon ki a betegség gyógyítására.

A bélidegrendszer két idegi plexusból áll, nevezetesen plexus myentericus és submucosusból, amelyek koncentrikus rétegekben helyezkednek el a bél falában. A bélidegrendszer komplexitását tükrözi az enterális neuronok változó száma és fenotípusának sokfélesége, amelyhez hozzájárul valamennyi típusú neurotranszmitter jelenléte. A bélidegrendszernek egy sajátos tulajdonsága, hogy az idegi plexusok lokális reflexköröket képeznek, amelyek nagymértékben függetlenek a központi idegrendszer funkciójától és a bél izomzatának kontraktivitását valamint, a Lieberkühn-kripták szekrécióját szabályozzák. A gasztrointesztinális rendszer embryonális fejlődése során a velőcső dorsalis régiójából kivándorló ganglionléc eredetű őssejtek belépnek a bél mesenchymájába, ahol a bélidegrendszer myentericus és submucosalis plexusok neuronjait és gliasejtjeit hozzák létre. Csirke-fürj velőcső transzplantációs kiméra kísérletek kimutatták, hogy a bélidegrendszer sejtjei a velőcső vagus (1-7. szomiták szintjéről) és a sacralis (a 28. szomitától caudálisan) régiójából ganglionléc sejtek jutnak a bélcső mesenchymális falába. A vagus régióból származó ganglionléc sejtek először az előbelet kolonizálják, majd a bélfalban caudális irányba fordulnak, intenzíven vándorolnak, differenciálódnak, osztódnak és közben a sejteknek a túlélésüket is meg kell őrizniük. Differenciálódásuk végén a gasztrointesztinális traktus neuron és glia elemeit hozzák létre. Az első ganglionléc sejtek csirke embryóban a 8. napon érik el a distalis vastagbélszakaszt (egérben 11,5 napos embryonális korban). Humán embryóban a ganglionléc sejtek caudális irányú migrációja az 5. gesztációs héten kezdődik és a 12. hétre fejeződik be. Néhány nappal a vagus régióból származó ganglionléc sejtek megérkezése után a sacralis velőcső régióból kiinduló ganglionléc sejtek is benépesítik a cloaca körüli mesenchymát, majd craniális irányba vándorolnak és a morfológiai adatok alapján feltehetőleg a distalis vastagbél beidegzéséhez járulnak hozzá.

Ha az embryonális fejlődés során az enterális ganglionléc sejtek vándorlása zavart szenved, akkor az aganglionózissal jellemzett, Hirschsprung-kór (*megacolon congenitum*) nevű születési rendellenesség jön létre. Ez a veleszületett, elsősorban a vastagbél idegrendszerét érintő elváltozás, emberben 1:5000 arányban fordul elő. A betegségre jellemző, hogy a ganglionléc sejtek caudális irányú migrációjának zavara miatt, a belső anális sphincter felett ganglionmentes szakasz alakul ki. Ez a bélszakasz nem képes relaxációra és állandó tónusos kontrakcióban van; a szűkület feletti bélszakasz pedig következményesen kitágul. A Hirschsprung-kórt jellemző megacolonról először Frederik Ruysch holland anatómus számolt be 1691-ben, de a betegség csak 1888-tól, Harald Hirschsprung dán orvos munkássága után vált ismertté. A Hirschsprung-kór 75-80%-ban a rectumra és a sigmabélre korlátozódik, a teljes bélszakaszt csak az esetek 8%-ában érinti. Ugyancsak bélidegrendszer fejlődési zavar áll a hypoganglionozis vagy a hyperganglionozissal és ectopicus ganglionok megjelenésével együtt járó neurodiszpláziák esetében is.

A bélidegrendszert létrehozó ganglionléc eredetű őssejtek differenciálódása, osztódása, vándorlási képessége nagymértékben függ a sejtek és a környező szövetek (bélmesenchyma, endothél, hámsejtek) közötti kölcsönhatásoktól. Humán biopsziákon végzett genetikai vizsgálatok szerint a mesenchymában termelődő glia-eredetű neurotrop növekedési faktor [GDNF] és a Ret nevű tirozin kináz receptorának, illetve az ugyancsak mesenchymális eredetű Endothelin-3 [EDN3; 21 aminosavból álló peptid] és a receptorának (EdnrB; G protein kapcsolt fehérje) mutációja áll a Hirschsprung-kór hátterében. A GDNF mitogénként és chemoattraktánsként hat a sejt felszíni Ret receptort expresszáló ganglionléc sejtekre, amelyek a koncentráció gradiens mentén kolonizálják a bél mesenchymáját. A Hirschsprung-kór familiáris megjelenésének több mint az 50%-áért a Ret gén mutációja felelős. Az EDN3

szerepe kevésbé világos, feltehetőleg a GDNF hatását szabályozza. Az EDN3 jelátvitel mutációja 10 %-ban a megacolon kiváltó oka.

Habár az elmúlt évtized Hirschsprung-kórt célzó genetikai vizsgálataiból számos további gén mutációját is azonosították (Bmp4, Hoxb5, Netrin, Hand2, retinsav, beta-1 integrin, Sox10, Sonic hedgehog), mégis a bélidegrendszer normális és kóros fejlődésében szerepet játszó fejlődésbiológiai mechanizmusokról csak kevés ismerettel rendelkezünk.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során klasszikus embryomanipulációs technikákat, morfológiai és molekuláris biológiai módszerekkel ötvözve vizsgáltuk a vastagbél idegrendszerének fejlődését.

A madárembryo kiváló modellrendszernek bizonyul a bélidegrendszer fejlődését célzó kutatások számára; (i) a madárembryo szemben az emlősökkel, lehetőséget nyújt olyan embryomanipulációs kísérletek elvégzésére, amelyek hatását a későbbi fejlődési stádiumokban is követni lehet, (ii) a kereskedelemben számos ellenanyag, rekombináns fehérje elérhető, amelyek emlősökben és madarakban egyaránt keresztreakálnak, (iii) a humán és madár embryók bélidegrendszerének fejlődésében tükröződő hasonlóságot pedig jól mutatja az a tény, hogy mindkét faj esetében az embryonális fejlődés idején két plexus (myentericus és submucosalis) alakul ki, míg az egérembryók esetében a plexus submucosalis csak a születés után jelenik meg.

Célkitűzéseink a következők voltak:

1. A ganglionléc-eredetű őssejtek vándorlásának és differenciálódásának karakterizálása, embryomanipulációs kísérletekkel történő nyomon követése a vastagbél idegrendszerének ontogenezise során.
2. Hogyan vesz részt a sacralis velőcső szakaszból származó ganglionléc a vastagbél idegrendszerének embryonális fejlődésében?
3. A bélcső mesenchyma sejtek által termelt *GDNF* és az *EDN3* növekedési faktorok kifejeződése és kölcsönhatása hogyan befolyásolja a bélidegrendszer fejlődését.
4. A bél endothél sejtjei és a vándorló ganglionléc eredetű őssejtek között fellépő kölcsönhatások feltárása a vastagbél idegrendszer fejlődésében.
5. Az embryonális béltraktus simaizomszövetének szerepe a bélidegrendszerre jellemző neurális plexus mintázatának kialakításában.
6. A bélidegrendszer fejlődését befolyásoló hám-mesenchyma kölcsönhatások feltárása embryomanipuláció módszerekkel.
7. A bélhám eredetű *Sonic hedgehog* növekedési faktor szerepe a bélidegrendszer fejlődésben.
8. A ganglionléc-eredetű őssejtek mikrokörnyezetét meghatározó ECM molekulák expressziós mintázatának jellemzése és funkciója a bélidegrendszer normál és patológiás fejlődése során.

III. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok:

A bélidegrendszer ontogenezisét célzó kísérleteink során csirke (*Gallus gallus domesticus*, White Leghorn típus), fűrj, (*Coturnix coturnix japonica*), vad típusú és Tg(fli1:EGFP), illetve HuC:EGFP transzgenikus (valamennyi endothel sejt, illetve neuron fluoreszcensen jelölt) zebrahal (*Danio rerio*), Sprague–Dawley patkány (*Rattus rattus*, Charles River Labs) és egér (*Mus musculus*) embryokat használtunk. A transzgenikus GFP-t (green fluorescent protein) expresszáló csirketojásokat Prof. Helen Sang jóvoltából a skóciai Roslin Intézetből (University of Edinburgh, UK) kaptuk.

A fejlődési kor meghatározására a Hamburger-Hamilton stádiumokat (HH), vagy az embryonális kort (E) alkalmaztuk. A csirketojásokat laboratóriumunk keltetőgépeiben 38 °C-on inkubáltuk. Az endothelin receptor B (EDNRB^{-/-}) (EDNRB^{tm1Ywa/J}; JAX#003295) null mutáns, Tau^{GFP/+} [Tau (Mapt) KO (ebben a transzgenikus egérben az összes neuron fluoreszcensen jelzett), JAX#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 kollaborációban Prof. Allan Goldstein (Harvard Medical School, Boston, USA) és Prof. Bjorn Olsen (Harvard Medical School) laboratóriumából szereztük be.

3.2. Sejtvonalak:

A ganglionléc sejtek vándorlását extracelluláris mátrixfehérjékkel (laminin, fibronectin) előkezelt felületen vagy különböző tápláló sejtréteggel bevont tenyésztőedényekben követtük nyomon. Sejtvonalak: humán hepatóma HepG2 (ATCC® HB-8065™) sejtvonal, transzformált csirke embryonális fibroblaszt (DF1; UMNSAH/DF1 (ATCC® CRL. 12203™), humán endothél sejtek. A primer humán endothél sejtenyészeteiket (Huvec), kollagenáz emésztés után történt kimosással, köldökvenéből alapítottuk. A kísérletekben saját alapítású csirke fibroblaszt sejtvonalat és simaizom sejtek primer sejtenyészetét is felhasználtunk (Nagy és mtsai., 2001). Korai és enterális ganglionléc sejteket 2, 5, illetve 7 napos csirke embryokból nyertük.

3.3. A minták szövettani feldolgozása:

3.3.1. Beágyazás és hisztotechnika: Szacharóz-zselatinos fagyasztott technika, paraffinos, Araldit műgyanta. Hisztotechnika: lektin kémia, enzim hisztokémia, immunhisztokémia, immunfluoreszcencia. Immuncitokémiai vizsgálatainkat fagyasztott metszeteiken és wholemount technikával a teljes embryon, illetve izolált teljes bélszakaszokon végeztük.

3.3.2. Felhasznált primer ellenanyagok: Ganglionléc markerek: HNK-1 (CD57), beta-1 integrin, és p75 (neurotrophin receptor), SOX10, L1CAM, Ncadherin, PHOX2B; Neuron markerek: HuC/D (neuron-specifikus RNS kötő fehérje), neurofilamentum, beta III-tubulin specifikus markerek, neurofilamentum specifikus ellenanyagok, CN (csirke neurit marker); Glia marker: Bfapb (brain-specific fatty acid binding protein), GFAP; Endothél marker: QH1 (fűrj specifikus endothél), Mep-21 (csirke specifikus anti-thromobomucin), CD31; Extracelluláris mátrixot (fibronectin, laminin, tenasczin-C, agrin, kollagén-I, -III, IV, VI, XVIII, versican, perlecan, chondroitin-szulfát és heparán-szulfát proteoglikánt) felismerő ellenanyagok. Kiméra markerek: QCPN (fűrj specifikus általános sejtmagmarker), 8F3 (csak a csirke sejteket jelöli); Egyéb ellenanyagok: anti-beta-1 integrin, anti-alpha-simaizom aktin, calponin, RCAS retrovírus GAG tokfehérjét jelölő 3C2-es ellenanyag; proteoglikán).

Az immunhisztokémiai reakciók előhívásakor kromogén szubsztrátként DAB vagy kloro-naphtolt használtunk. Az egyszeres, kettős és hármas immunfluoreszcencens jelölések estében az ellenanyagok kötődését Alexa fluorokrómokkal jelöltük.

3.3.3. Proliferáció és apoptózis.

A sejtosztódás mértékét BrdU és EdU jelöléssel vagy anti-phosphohiston-3 ellenanyaggal, míg az apoptózist anti-caspase 3 ellenanyag alkalmazásával mutattuk ki.

3.3.4. Immunelektronmikroszkópia.

A preembedding kettős festés során az első ellenanyag kötődését peroxidáz reakcióval DAB-NiSO₄-al mutattuk ki, amit a második primer ellenanyag kimutatására Streptavidin-Gold jelöléssel egészítettünk ki.

3.3.5. In situ hybridizáció.

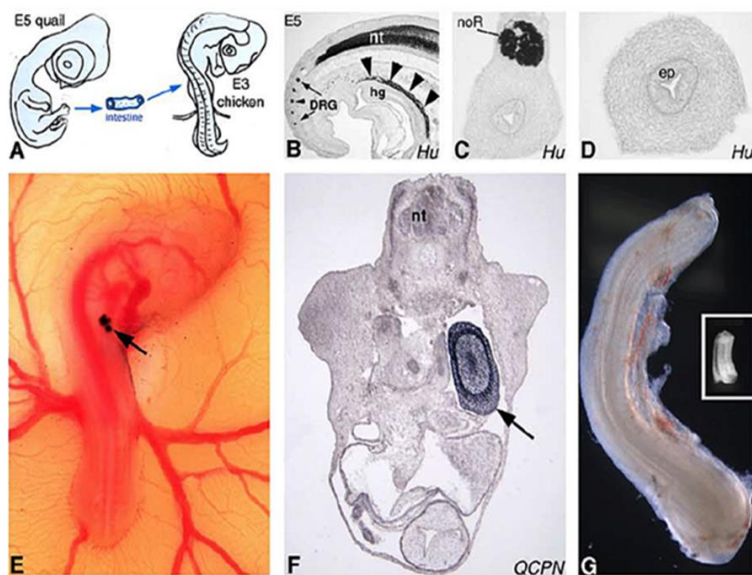
A GDNF, EDN3, EDNRB, BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMPRII, Noggin, SHH, IHH, PTCH1 és PTCH2 gének expresszióját digoxigenin-jelzett *in situ* hybridizációval vizsgáltuk.

3.4. **Embryomanipulációs módszerek:**

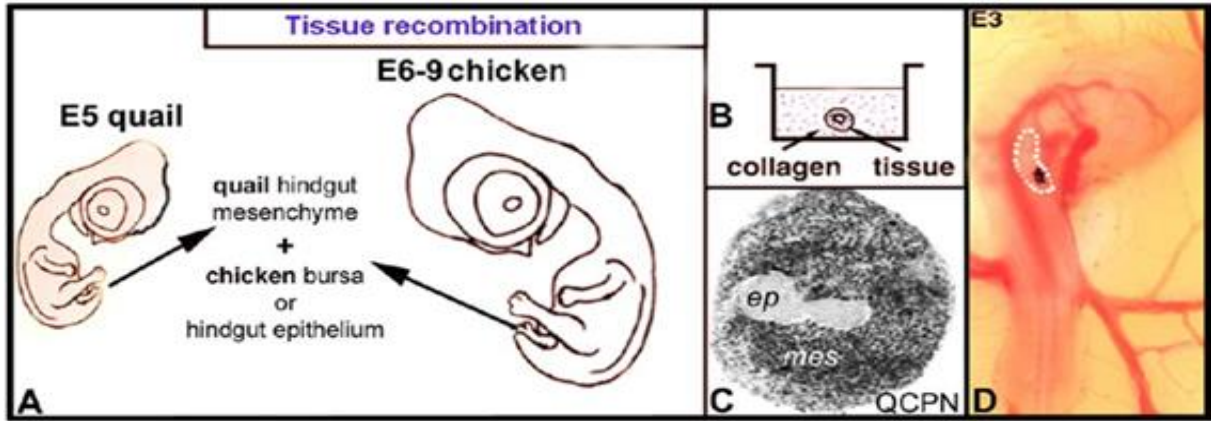
3.4.1. Csirke-fürj, fürj-csirke, csirke-egér, csirke-patkány embryonális testüreg kimérák.

A testüregkimérák alkalmasak az embryonális szervek hosszú távú *in vivo* tenyésztésére és a ganglionléc eredetű összejek differenciálódásának *in vivo* nyomkövetésére. A testüreg kimérákat a nyirokszervek fejlődésének kísérletes tanulmányozásánál leírtak szerint állítottuk össze (Nagy és mtsai., 2004; 2005; Nagy és Oláh, 2010). Emlős embryok esetében 11.5 napos egér és patkány embryokból kiperparált utóbélről eltávolítottuk a coecumot, majd a preganglionotikus (aneurális) utóbélszakaszt steril szénszemcsével történő megjelölést követően 3 napos (HH18 stádiumú) csirke embryo testüregébe transzplantáltuk és a kimérákat 7-14 napig inkubáltuk (1. ábra).

Hám-mesenchyma rekombinációs kísérletekben az 5-8 napos csirke embryo eredetű bél epitheliumot, illetve bursa Fabricii-ből izolált epitheliumot rekombináltuk 5 napos fürjembryok utóbél mesenchymájával. A rekombináció előtt a szöveteket 0,03%-os kollagenázzal enzimatikusan és saját készítésű wolframkésekkel microsebészetileg elválasztjuk egymástól. A rekombinált szöveteket 12 óráig kollagén szervtenyésztetben inkubáltuk, hogy a szövetek közötti integritás újra létrejöjjön, majd a rekombinált szövetet 3 napos embryo testüregébe ültettük és 10-14 napig inkubáltuk (2. ábra).



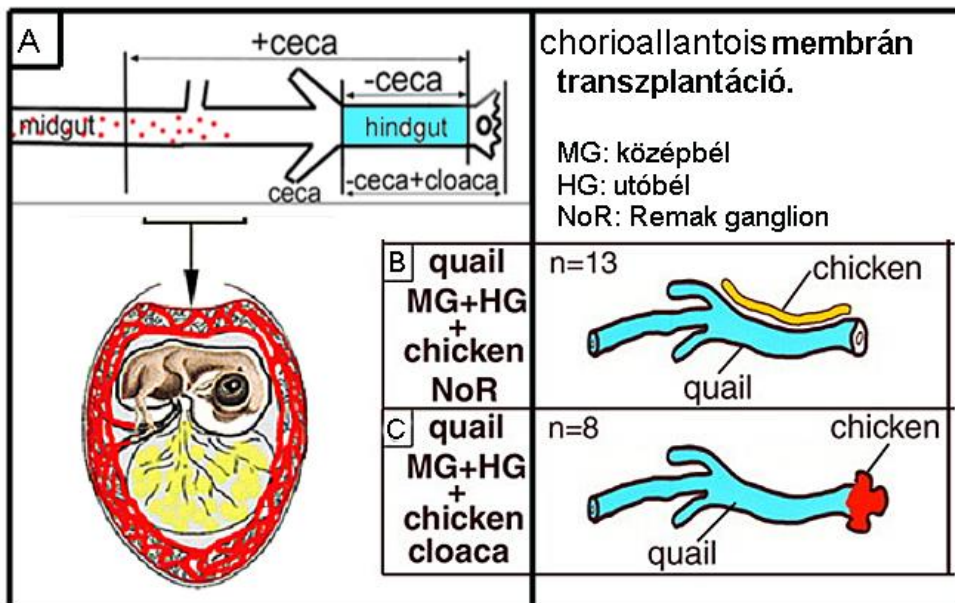
1. Ábra. Testüreg kiméra I. A.) A fürj, csirke vagy emlős embryokból származó vastagbélszakaszokat 3 napos csirke embryok testüregébe ültettük és a kiméra embryokat 7-14 napig inkubáltuk. **B-D.)** A transzplantált preganglionotikus szövetek 24 óra alatt vaszkularizálódnak, ganglionléc sejtekkel kolonizálódnak, és elindul a szöveti differenciálódásuk. **E.)** A graftokat szénszemcsével jelöltük meg. 3 napos csirke embryo: a graft a szív mögött található primitív testüregben helyezkedik el. **F.)** QCPN fürj specifikus ellenanyag a transzplantált belet jelöli 24 órával a beültetést követően. **G.)** A graftok mérete a transzplantáció előtt és az inkubálás végén.



2. ábra: Testüreg-kiméra II. A.) Hám-mesenchyma rekombináció sémás rajza. Különböző fajokból származó epithelio-mesenchymális szervek szöveti rekombinációját követően a mesterséges szerveket kollagén alapú tenyészetekben **(B, C)** tartjuk és 24 órával később testüregbe **(D)** ültetjük. A szöveti rekombinációs kísérletek alkalmasak az intesztinális hám és a nem-intesztinális eredetű hámsejtek (pl. bursa Fabricii, ami a cloacához asszociált primer lymphoepithelialis szerv) bél mesenchymára és a bélidegrendszer fejlődésére kifejtett hatásának tanulmányozására.

3.4.2. Chorioallantois membrán transzplantáció.

A chorioallantois membrántenyésztés alkalmas arra, hogy nagyobb méretű embryonális szerveket vagy *in vitro* rekombinált szöveteket hosszabb ideig *in vivo* körülményekhez hasonló milióban tenyesszük. A kísérletek során 8 napos csirke embryok chorioallantois membránján 7-9 napig tenyésztettük a csirke és fűj embryokból származó bél és cloaca szakaszokat (3. ábra). Az embryonális szervrekombinációs kísérletekben a fűj és csirke embryoból származó cloaca és vastagbélszakaszokat *in vitro* rekombináltuk. Ezt követően a rekombinált szerveket a chorioallantois membránra való transzplantáció előtt 24 órát kollagén gélbe ágyazva inkubáltuk, hogy létrejöhessen a különböző fajokból származó szövetek adhéziója.



3. ábra: Chorioallantois membránon (CAM) történő eltenyésztés. A.) Az 5E embryoból kiperparált utóbélszakaszokat 8 napos fűj vagy csirke embryo chorioallantois membránján *in ovo* tenyésztjük.

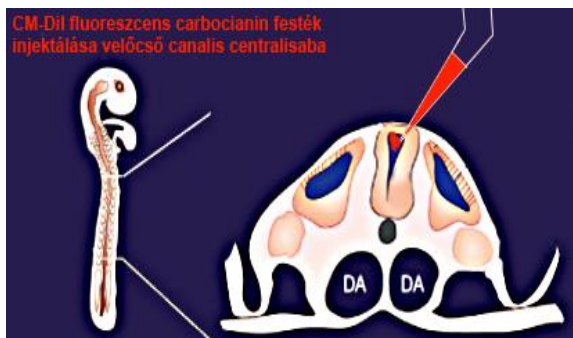
3.4.3. Microgyöngy embryonális transzplantációja (4. ábra).

Sejtek, szövetek differenciálódását befolyásoló morfogének tanulmányozására olyan hordozókat használhatunk, amelyek segítségével a növekedési faktorokat lokálisan a kívánt helyre lehet az embryoba bejuttatni. A 4. ábrán az alsó végtag alatt látható fehér kerek folt a microgyöngy; a felvétel a microgyöngy utóbél-cloaca régióba történő implantációjának előkészítésekor készült. A micromanipulációs eljárás során 70-100 μm átmérőjű heparin-acril microgyöngyöket (Sigma) EDN3, GDNF vagy Shh növekedési faktorok oldatába, valamint BQ788 (EDN3 jelátvitelt gátolja) és anti-GDNF funkcióblokkoló ellenanyag steril oldatába 4-12 órát áztattunk. Az előkezelt microgyöngyöket az 5 napos embryoból izolált vastagbél mesenchymális falába implantáltuk, 72 óráig tenyésztettük, vagy testüregkimérákat készítve embryonális testüregbe transzplantálva további 7 napig inkubáltuk.



4. ábra

3.4.4. Carbocianin-alapú vitális sejtjelölés (5. ábra).

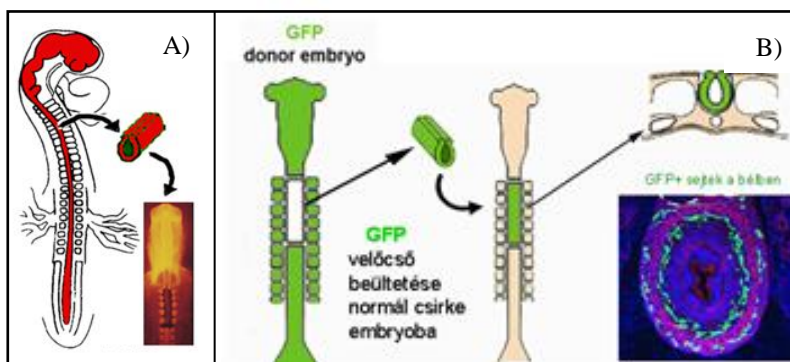


5. ábra

Vybrant CM-Dil (Life Technologies) fluoreszcens carbocianin festéket 2 napos (HH10-11 stádium) csirke embryok velőcsővének canalis centralisába injektáltunk. A CM-Dil lipofil festék specifikusan megjelöli a sejtmembránt. Ezzel a módszerrel a velőcsőből kivándorló ganglionléc sejteket jelöltük meg.

3.4.5. Velőcső eltávolítása és transzplantációja microsebészeti módszerekkel (6. ábra).

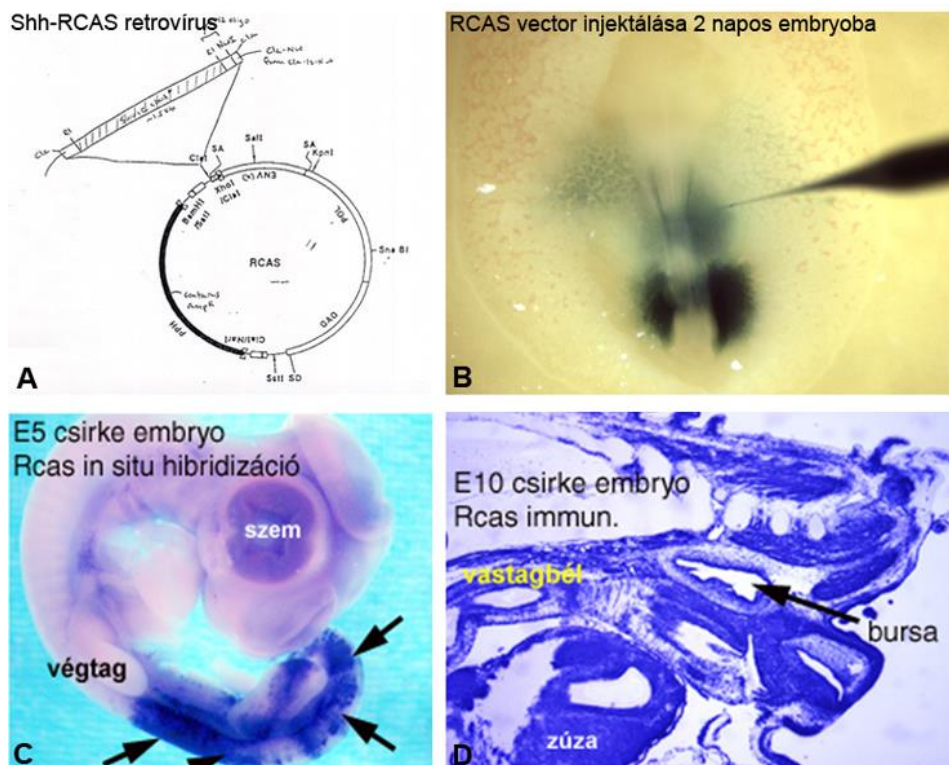
A velőcső ablációs kísérletek alkalmasak a neurocristopathiak fejlődésének kísérletes tanulmányozására. Az embryo-manipuláció során, steril körülmények között felnyitott HH11 stádiumú csirke embryon mikrokésekkel vágást ejtünk a velőcső kétoldalán, 0,03%-os kollagenáz kezelést követően (20 perc, 37° C) a velőcsövet kiemeljük, megtartva a chorda dorsalist épségét és az embryokat kikelésig inkubáljuk.



6. ábra: A) velőcső abláció B) GFP velőcső kiméra

3.4.6. Funkciónyerés és funkcióvesztéses mutációk csirke embryóban történő kiváltása replikáció-kompetens RCAS retrovírusokkal.

Az utóbbi években nagy szerepet kaptak az olyan újszerű génmanipulációs módszerek (retrovírus-technika, elektroporáció), amelyek segítségével madár embryokban is előidézhető célzott mutáció. A retrovírusok segítségével madár embryokban célzott funkciónyerő és funkció-vesztő mutációt lehet létrehozni. Erre alkalmasak az olyan retrovirális vektorok, amelyek madarakat megfertőző Rous-sarcoma vírusból módosított, replikáció-kompetens vírusokból (RCAS) készíteneek. Az RCAS-okban az RNS a genetikai anyag és ezt egy reverz transzkriptáz fordítja vissza DNS-re. Az RCAS retrovírusokba tetszőleges gének klónozhatók önállóan, illetve egy meglévő markergénnel (GFP) együtt (7. ábra, A kép). Ez a módszer jól alkalmazható transzkripció vagy növekedési faktorok, receptorok, adhéziós molekulák és egyéb jelátviteli molekulák fejlődésbiológiai funkciójának vizsgálatára. Az *E. coli* törzsekben felszaporított retrovírus plazmidot első lépésben a DF1 fibroblaszt sejtvonalon tenyésztettük, majd az ultracentrifugálással bekoncentrált víruspartikulumokat a 2 napos csirke embryo leendő vastagbéltelep mesenchymájába injektáljuk (7. ábra, B kép). A vírus az embryo történi injektálás után az osztódó sejteket fertőzi meg, ahol a retrovírus beépül az újonnan keletkezett sejtek genomjába. Kísérleteinkben a következő RCAS vektorokat használtuk: Noggin-RCAS, Shh-RCAS, GDNF-RCAS és siRNS-GDNF-RCAS. Az *in ovo* kísérlet során Narishige microinjektorhoz rögzített 100 µl-es Hamilton fecskendő segítségével, vékony üvegapillárison keresztül 5 napos embryo vastagbélbe 2-5 µl Shh-RCAS retrovírus szuszpenziót vagy Cyclopamine-t (3 µM) injektáltunk (7. ábra, C, D kép).



7. ábra: RCAS retrovírus intraembryonális injektálása. A.) Shh-RCAS retrovírus plazmid térképe. **B.)** Fast Green jelzett vírusoldat injektálása az utóbél telepébe. **C.)** RCAS fertőzés kimutatása *in situ* hibridizációval és **(D)** a vírus GAG fehérjét felimerő 3C2 ellenanyag immuncitokémiával.

3.5. Sejt-, szerv-, és embryotenyészetek

3.5.1. Az enterális idegi őssejtek izolációja, felszaporítása és in vitro differenciáltatása.

A felnőtt idegi őssejtek *in vitro* tenyésztéséhez 3 hetes Wnt1;tdT vagy Plp1^{GFP} és Tau^{GFP/+}egérből származó fluoreszcens sejt-szorterrel (BD FACSAria III) kiválogatott sejteket használtunk.

3.5.2. Velőcső és bélcső tenyészet.

A ganglionléc sejtek migrációját E5 középbel és E2 velőcső tenyésztésével vizsgáltuk. (8. ábra, A kép).

3.5.3. Kollagén alapú 3-D szervtenyészet.

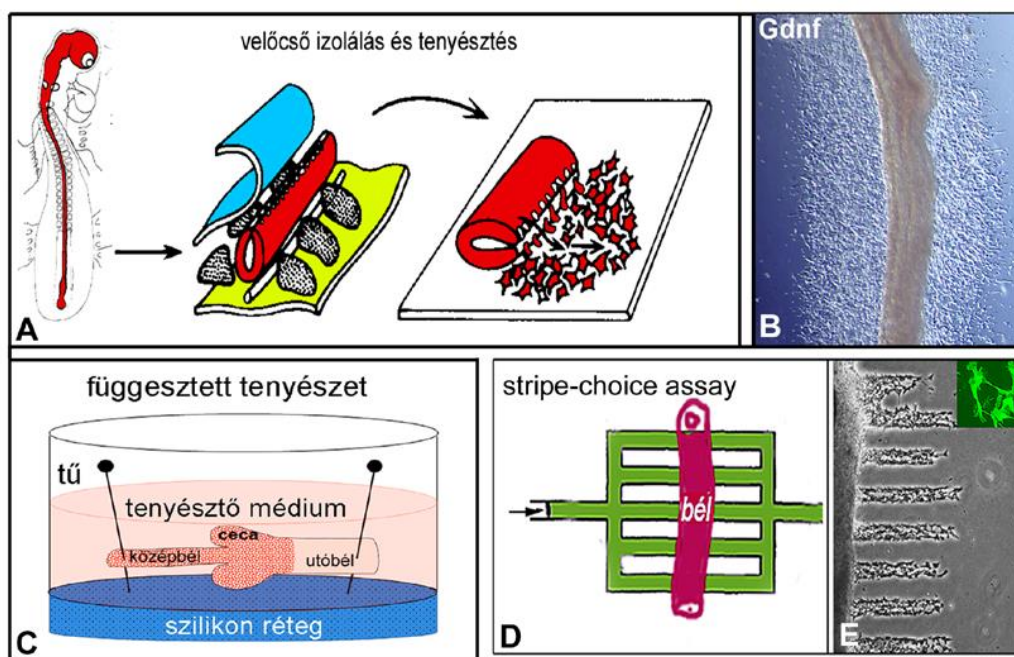
Kísérleteink során az 5E embryokból izolált középbelet és utóbelet tartalmazó bélszakaszt I-es típusú kollagén alapú mátrixba ágyazva 48-72 óráig tenyésztettük. Ez a módszer alkalmas arra, hogy a mátrixba oldott morfogén hatását vizsgálhassuk. (8. ábra, B kép).

3.5.4. Függesztett 3-D szervtenyészet.

A függesztett szervtenyészetek esetében a morfogént a tápoldatba oldjuk. (8. ábra, C kép).

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

Az enterális ganglionléc-eredetű sejtek *in vitro* vándorlásának tanulmányozására szilikon matricák segítségével műanyag tenyésztőedényre 90 µm szélességű sávokban 10 µg/ml laminint, 20 µg/ml fibronektint, 2 µg/ml agrint vagy 50 µg/ml endosztatint vittünk fel. Az ECM sávokra merőleges orientációban (8. ábra, D, E kép) 7 napos csirke embryóból származó középbelet helyeztünk, majd a tenyésztőedényhez 10 ng/ml GDNF tartalmú DMEM-et adtunk.

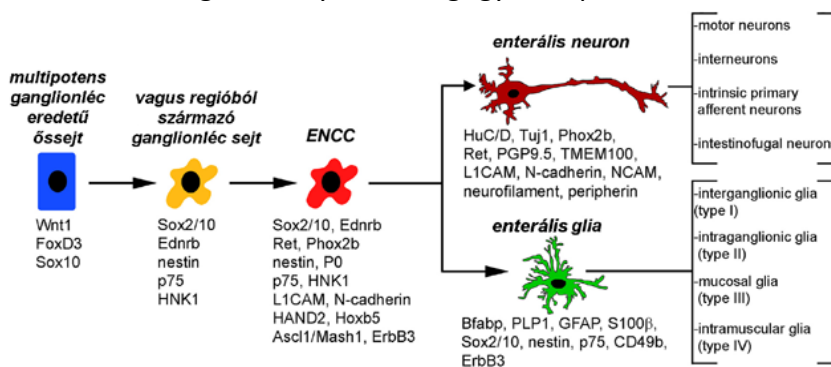


8. ábra: A.) Ganglionléc sejt izolálása és ECM-el bevont felszínen *in vitro* tenyésztése. **B, C.)** Embryonális bél 3-D kollagén alapú mátrix és függesztett 3-D szervtenyészet. A szerveget 3 napig tenyésztettük. **D.)** *In vitro* sejt migrációs teszt (‘stripe choice assay’). Az ECM sejt migrációra gyakorolt hatását ‘stripe choice assay’ technikával lehet kísérletesen vizsgálni. A sémás rajz a műanyag tenyésztőedény felszínére sávokba nyomtatott ECM mintázatot (zöld) és a sávokra merőlegesen explantált embryonális bélszakaszt mutatja. **E.)** A tenyésztőedény aljára nyomtatott ECM sávokon vándorló HNK1+ (fluoreszcens kép) ganglionléc-eredetű sejtek csoportjának mikroszkopos felvétele.

IV. A TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA:

4.1. Vagus régióból származó ganglionléc sejtek vándorlása és differenciálódása.

Habár a madár embryo alkalmas modellnek tekinthető az idegrendszert célzó kutatásokban, a bélidegrendszer differenciálódásának tanulmányozása, részletes immuncitokémiai karakterizálása eddig még nem történt meg. Munkánk első lépésében a csirke és fürj embryok fejlődő bélidegrendszerének immuncitokémiai, valamint *in situ* hybridizációval történő karakterizálását végeztük el. Vizsgáltuk a ganglionléc sejtek bél falban történő vándorlását és glia, valamint neuron irányú differenciálódását. Attól a ponttól kezdve mikor a ganglionléc eredetű sejtek belépnek az előbél mesenchymájába már enterális ganglionléc eredetű sejteknek (ENCC) nevezzük. Kimutattuk, hogy a korábban ismert korai ganglionléc sejtekre specifikus HNK-1 marker mellett, a p75 specifikus ellenanyag is alkalmas a differenciálatlan ganglionléc sejtek azonosítására. A p75 specifikus poliklonális ellenanyag specifikusabb membránfestést ad a metszeteken és több lehetőséget kínál az egér monoklonális ellenanyagokkal való kettős immunfluoreszcens jelöléseknél. A vagus régióból származó HNK-1+/p75+ ganglionléc sejtek első csoportja az előbélben keresztül a 6. embryonális napon éri el a középbél és utóbél határán található coecum telepét. A HNK-1+/p75+ ENCC-k SOX10, L1CAM és N-cadherin molekulákat expresszálnak. A 7. embryonális napon a ganglionléc sejtek belépnek az utóbél proximális szakaszába és a 8. embryonális nap végére már az utóbél disztális szakaszát is kolonizálják. A 9 napos embryóban már jól láthatók a ganglionléc sejtek aggregációjából fejlődő myentericus és submucosalis ganglionok. Az utóbélben vándorló ganglionléc sejtek között beta III-tubulin, neurofilamentum és a HuC/D markerekkel a neuronokat, míg a Bfap specifikus ellenanyaggal a korai glia sejteket azonosítottuk. A ganglionléc-eredetű sejtek specifikus immuncitokémiai kimutatásának igazolására embryomanipulációs módszerrel kísérletesen is igazoltuk a velőcső vagus szakaszából kivándorló GFP (green fluorescent protein)-re transzgenikus ganglionléc sejtek vándorlási útját és differenciálódását. Mindezek alapján a következő modellt javasoljuk az ENCC-k differenciálódásának karakterizálásához: a HNK-1, p75, SOX10 és az N-cadherint differenciálatlan ENCC-k fejezik ki és az idegsejtekben, vagy a gliában a differenciálódás után is expresszálnak. Az L1-CAM, amelyet kezdetben az összes ENCC-t jelöli, a neuronális vonalra korlátozódik, míg a SOX10 expressziója, amit kezdetben szintén az összes ENCC-ben kimutatható, a differenciált enterális neuronokban lecsökken és a glia prekursor populációra korlátozódik, hasonlóan az egér embryóban megfigyelt expressziós mintázatához.



9. ábra: Az ENCC-k differenciálódása

A részletes immuncitokémia karakterizálásból és velőcsőtranszplantációból kapott eredmények megerősítik a bélidegrendszer fejlődésének hasonlóságát a madár és a rágcsáló embryok között és vezérfonalként fog szolgálni a madár bélidegrendszer fejlődését célzó további kísérletekhez.

4.2. A plexus pelvicus fejlődése és szerepe a disztális vastagbél idegrendszerének képzésében.

A plexus pelvicut a sacralis velőcsőszakaszból származó ganglionléc sejtek hozzák létre. Az első HNK1+ ganglionléc sejtek az 5-6. embryonális napon érik el a cloaca körüli mesenchymát. Ezekből a sejtekből a következő napokban a plexus pelvicus Hu+ neuron és B-fabp+ gliasejtekből álló dús ganglionhálózata alakul ki. Csirke-fürj szervrekombinációs kiméra technikát ötvözve chorioallantois membránon történő tenyésztéssel kísérletesen is igazoltuk, hogy a ganglionléc őssejtek először a cloaca mesenchymáját kolonizálják. A megtelepedett sejtek a plexus pelvicut hozzák létre, majd a differenciálatlan ganglionléc sejtpopuláció tovább vándorol és a fejlődő disztális vastagbélben a plexus myentericus ganglionjainak kialakulásához járulnak hozzá.

4.3. A GDNF és az Endothelin-3 növekedési faktorok vastagbél idegrendszer fejlődésében betöltött szerepe.

a) A GDNF expressziós mintázata a fejlődő béltraktusban és szerepe az enterális ganglionléc sejtek ontogenezisében.

A RET+ ENCC-re a bélmesenchymában termelt GDNF növekedési faktor chemoattraktánsként hat, koncentrációgrádiens hoz létre és így biztosítja a ganglionléc sejtek bélfalban történő irányított vándorlását. A GDNF a ganglionléc sejtek differenciálódását és osztódását befolyásoló hatása kevésbé ismert. A kérdés megválaszolására először *in situ* hybridizációval a GDNF embryonális expresszióját határoztuk meg, majd koncentrációjának változtatásával funkciójára próbáltunk magyarázatot adni. Az *in situ* hybridizációs eredmények szerint a GDNF először a 3 napos embryo nephrogén mezoderma sejtjeiben jelent meg, majd az 5 napos embryóban a gyomor, a coecum és a cloaca mesenchymájában expresszáldott. A GDNF kifejeződése a 6. naptól kezdve a leendő neurális plexusok helyén, a bélfal külső mesenchyma sejtjeiben található. A GDNF koncentrációgradiensének megváltoztatásával próbáltuk megérteni a ganglionléc sejtekre gyakorolt hatását. Magasabb koncentráció kiváltására rekombináns GDNF proteinben áztatott microgyöngyöket ültettünk a 6 napos embryo vastagbélének proximális falába. 72 órával később a ganglionléc sejtek többsége a microgyöngy köré csoportosult. Ugyancsak migrációt serkentő hatást kaptunk akkor is, ha kollagén gélbe oldottuk a GDNF-et és így tenyésztettük a 6 napos embryonális beleket. A GDNF stimulusra a sejtek kivándoroltak a bélfalból. A GDNF fokozta tehát a sejtek vándorlását. A GDNF kezeléssel ellentétes eredményt kaptunk; amikor az embryonális vastagbél falába transzplantált microgyöngyöket előzetesen anti-GDNF ellenanyagba áztattuk és a funkcióblokkoló ellenanyag gátolta a ganglionléc sejtek migrációját. RCAS-GDNF és siRNS-RCAS-GDNF retrovírusokkal funkció-nyeréses és funkció-vesztéses mutációkat idéztünk elő a fejlődő 2 napos embryokban. Az első esetben túlzott koncentrációban expresszáldott a GDNF, míg az siRNS-technikával az endogén GDNF géncsendesítése volt a cél. A magas GDNF koncentráció serkentette a sejtek proliferációját és a ganglionléc sejtek korai HuC/D+ neuron irányú differenciálódását váltotta ki. A GDNF koncentrációjának lecsökkentése a ganglionléc sejtek vastagbélben történő vándorlását késleltette, mérsékelte a sejtosztódás mértékét, s ezzel a proximális szakaszokban hypoganglionosist idézett elő.

b) Az Endothelin-3 (EDN3) expressziós mintázata a fejlődő béltraktusban és szerepe az enterális ganglionléc sejtek ontogenezisében.

GDNF-nek és RET receptorának a mutációja a teljes vastagbél ganglionmentességét hozza létre. Az EDN3 nem hat chemoattractáns faktorként a ganglionléc sejtek migrációjára, de mutációjakor mégis hiányoznak a distalis vastagbél ganglionjai. Ezt az ellentmondást *in vitro* szervtenyészetekkel és csirke-fürj kimérák alkalmazásával próbáltuk feloldani.

Először *in situ* hybridizációval vizsgáltuk az EDN3 és EDNRB expressziós változását a csirke embryóban. A GDNF-hez hasonlóan itt is azt találtuk, hogy az EDN3 expressziója a béltraktus fejlődése során először az 5E coecum mesenchyma sejtjeiben jelenik meg és kifejeződése a következő napokban a vastagbél mesenchymájában is kimutatható. A vándorló ganglionléc sejtek az EDN3-at felismerő EDNRB receptort expresszálják.

Kimérés kísérleteinkkel egy új embryomanipulációs technikát vezettük be: fürj embryonális vastagbélszakaszokat a ganglionléc sejtek kolonizációja előtt izoláltuk és EDN3 vagy az EDNRB antagonistá BQ788 oldatába tenyésztettük, majd 3 napos csirke embryok testüregébe ültettük és 7 napig inkubáltuk. A fogadó embryokból izolált graftokat faj- és sejtspecifikus ellenanyagokkal festettük meg. A transzplantációra használt csirke ganglionmentes vastagbél graftokat a fogadó fürj embryok ganglionléc sejtjei kolonizálták. Ha a graftokba előzetesen EDN3 növekedési faktort juttattunk, akkor a donor vastagbelekben a kezelés hatására a ganglionléc sejtek intenzívebben osztódtak és hyperganglionosist okoztak. Az EDNRB funkcióját blokkoló BQ788 kezelés következményeként hypoganglionosis alakult ki. Továbbá, amikor 5 napos embryokból izolált középbél-vastagbél darabokat kollagénmátrixban tenyésztettük azt találtuk, hogy az EDN3 gátolta a neuronok terminális differenciálódását. EDN3 hiányában a ganglionléc sejtek korábban differenciálódnak NOS neurotranszmittert termelő neuronokká és ezek a ganglionléc sejtek már nem tudják befejezni a vastagbél kolonizációját.

4.4. Az endothél sejtek szerepe a vastagbél idegrendszer fejlődésében.

Előzetes morfológiai eredményeink alapján kimutattuk, hogy madár embryóban a vastagbél endothél sejtek, megelőzve a ganglionléc sejtek bevándorlását, két koncentrikus gyűrűbe rendeződnek a leendő myentericus és submucosalis plexusok területén. Ez a véletlenszerű morfológiai megfigyelés vetette fel azt az elképzelést, hogy az endothél sejtek a bélidegrendszer prekursorainak vándorlását és differenciálódását befolyásolhatják.

a) Az endothél sejtek és a ganglionléc sejtek együttfejlődésének immuncytokémiai karakterizálása zebrahal, madár és humán embryok vastagbél fejlődése során:

Munkánk kezdetén immuncytokémiai módszerekkel vizsgáltuk az endothél sejtek prekursorainak differenciálódását és a primér erek kialakulását a fejlődő embryok bélcsatornájában. Madár embryokban endothél specifikus ellenanyagokat, zebrahal esetében pedig GFP fehérjére transzgen endothél mutáns törzset használtunk. Ezekben a zebrahal embryokban minden endothél sejt zölden fluoreszkál. Humán embryokban CD31 ellenes antitestekkel vizsgáltuk az endothél sejtek fejlődését. Az endothél festésekkel párhuzamosan, a ganglionléc eredetű sejtek (neuron, glia) vastagbélben történő differenciálódásának, erekhez viszonyított lokalizációját és migrációját is nyomon követtük.

b) Endothél és a ganglionléc eredetű progenitorok fejlődésében fellépő kölcsönhatások in vivo vizsgálata:

5 napos fűrj embryo középbelében, és 7 napos embryok vastagbelében a QH1+ endothél és a HNK-1+ ganglionléc eredetű sejtek szoros közelségben fejlődnek. Kollaborációban Dr. Brant M. Weinstein (Laboratory of Molecular Genetics, National Institutes of Health, Bethesda, MD) kutatócsoportjával ezt a fejlődésbiológiai jelenséget, 5 napos zebrahal embryokon is megfigyeltük. A halak ganglionléc eredetű sejtjeit HuC/D antitesttel jelöltük. Kettős immunfluoreszcens jelöléssel igazoltuk, hogy a HuC/D ganglionléc eredetű sejtek az endothél sejtek szomszédságában vándorolnak. Dr. Alan Burns (UCL, Institute of Child Health, Neural Development Unit, London, UK) kutatócsoportjával együttműködve 7, 8, 9 hetes humán embryok vastagbél metszeteiben is tanulmányoztuk a ganglionléc és endothél sejtek időben és térben való kolokalizációját. Eredmény: az endothél sejtek és a vastagbélben található myentericus ganglionléc sejtek egymás mellett fejlődnek.

c) c.) VEGF jelátvitel gátlásának hatása az utóbél fejlődésére: szervtenyészet.

A VEGF az endothél sejtek fejlődését stimuláló faktor. VEGF inhibitorok (SU5416 és VEGF-R1-gátló protein) alkalmazásával az intestinális erek kialakulását gátoltuk és az erek hiányának a bélidegrendszer fejlődésére gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Eredmények: VEGF inhibitorok gátolták az endothél sejtek kialakulását és megakadályozták a ganglionléc sejtek vándorlását is.

d) Endothél és a ganglionléc eredetű progenitorok fejlődésében fellépő kölcsönhatások in vitro vizsgálata:

Endothél-ganglionléc rekombinációs kísérletekben tanulmányoztuk a két sejtípus egymásra gyakorolt hatását. A kísérletekben ganglionléc sejteket tartalmazó 2 napos embryonális velőcső és 5 napos középbel szakaszokat rekombináltuk mátrix fehérjék (fibronektin, laminin) vagy különböző sejtekkel bevont (embryonális simaizom, fibroblaszt, humán HepG2 epithél és humán endothél) bevont tenyésztőlemezek felszínén. A laminin és fibronektin szubsztrátuma a velőcsőből származó ganglionléc sejtek vándorlását serkentette. Embryonális bélcsővel végzett explantációs kísérleteinkben is hasonló eredményeket kaptunk azaz, a bél ganglionléc eredetű sejtjei is nagy affinitással vándorolnak laminin és fibronektin mátrix felszíneken. Amikor a mátrixfehérjék helyett sejteket használtunk aljzatként, akkor a ganglionléc sejtek vándorlásakor csak az endothél sejtek bizonyultak ideális környezetnek. A sejtek vándorlását, úgy a laminin mátrixon, mind a HUVEC sejteken meggátolta a beta-1 integrin blokkoló ellenanyag. Ezzel a kísérletsorozattal először igazoltuk, hogy az endothél sejtek irányító szerepet játszanak az enterális ganglionléc sejtek vándorlásában.

4.5. A simaizom szerepe a bélidegrendszer fejlődésében.

Az erekhez hasonlóan az bél simaizom rétegei is szoros anatómiai kapcsolatban vannak a bélidegrendszer elemeivel, és az simaizomsejtek szubsztrátként szolgálhatnak az ENCC-k migrációjának és proliferációjának irányításához és előmozdításához. A bélidegrendszernek két fő ganglionált plexussal (submucosalis és myentericus) kialakult sugármintázatát a kör alakú izomréteg határolja. Ez arra utal, hogy simaizomra szükség van a koncentrikus helyzetű radiális mintázat létrejöttéhez.

Csirke embryokból származó bélszöveten végzett vizsgálatokból megállapítottuk, hogy a bél simaizomrétege és a bélidegrendszer fejlődése eltérő sorrendet követ a középbélben és az utóbélben. A középbélben az ENCC-k érkezése megelőzi a simaizom differenciálódást, de ez a sorrend megfordul az utóbélben, ahol a simaizom alakul ki először. Mind az alpha-simaizom aktin (SMA), mind a calponin, azaz a korai és a késői izom differenciálódásra jellemző molekulák expressziója az ENCC-k érkezése előtt kifejeződik. Szervtenyészetekből kapott eredményeink pedig azt mutatják, hogy a bél simaizomjának alapvető szerepe van az ENS kialakításában. Az FK506 egy immunszuppresszív gyógyszer, amely gátolja a simaizom differenciálódását. Az AG1295 egy vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptor antagonistája, amely egér embryóban gátolja a viscerális simaizom differenciálódását. Megállapítottuk, hogy a simaizom fejlődését a két reagens kombinációja gátolja a leghatékonyabban. Az inhibitorok megakadályozták az SMA expresszióját a középbélben, jelezve, hogy az alpha-simaizom aktint expresszáló kora simaizomszövet differenciálódása a középbél szakaszán nem történt meg, a mesenchyma differenciálatlan maradt. Ebben az esetben mindig rendellenes bélidegrendszer alakult ki. Ezzel szemben az utóbélben, ahol az alpha-simaizom aktin már kifejeződik az ENCC-k megérkezése előtt, az AG1295/FK506 az alpha-simaizomaktin expresszióját nem változtatta meg. Az inhibitorok azonban megakadályozták a calponin expresszióját, ami a késői simaizom differenciálódás markere. Annak ellenére, hogy a calponin nem expresszálódott, az ENCC migrációja és a koncentrikus mintázat kialakulása az utóbélben normálisan zajlott. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy az alpha-simaizom aktint expresszáló korai izom-specifikáció elengedhetetlen az ENS mintázatához, míg az izmok későbbi differenciálása nem befolyásolja a bélidegrendszer fejlődésének mintázatát.

4.6. Hám-mesenchymális kölcsönhatások határozzák meg a bélidegrendszer radiális szimmetriát mutató fejlődését.

Epithelium-mesenchyma kölcsönhatásokat célzó *in vitro* kutatások szerint a mesenchymális milió mellett hám-eredetű morfogének is nagymértékben meghatározzák a bélfal sejtjeinek differenciálódását. A Hedgehog növekedési faktor családba tartozó Sonic hedgehog (Shh) növekedési faktort három évtizede azonosították először gerinces állatokban, valamint emberben. Az embryonális fejlődés kezdetén a gerinchúrnban, majd később a végtagbimbókban és a bélcső entodermájában fejeződik ki és a mesenchymára fejt ki hatását. A Shh más növekedési faktorokat (BMP-4, Wnt, stb) valamint homeobox (HOX) géneket aktiválva, a bélcsatorna organogenezisében lejátszódó kezdeti sejtosztódást, differenciálódást és az egyes kompartmentek (előbél, vékonybél átmenet, coecum, utóbél, cloaca) elkülönülését irányítja. Mutációja esetén a fejlődő bélcsatornában nyelőcső sipoly (fistula oesophago-trachealis), pancreas hiány és cloaca malformatio jelentkezik. Heterozigóta Shh mutáns egerekben a bél mesenchymális sejtjei mellett a bélidegrendszer is rendellenesen fejlődött; ganglionmentes szakaszok és ectopikus ganglionok alakultak ki. Ezek a kísérletek ugyanakkor nem mutattak rá arra, hogy a Shh közvetlenül a ganglionlécsejtekre hat-e vagy a bél mesenchymasejtek differenciálódásának befolyásolása révén szabályozza a normális bélidegrendszer kialakulását. Mindezen adatok alapján feltételezzük, hogy a bélrendszer gyakori veleszületett elváltozásának a megacolon congenitum (Hirschprung-kór) megjelenésében a hámeredetű Shh morfogén is fontos szerepet játszhat.

Szervtenyésztés, szövetrekombináció, csirke-fürj kiméra, chorioallantois membrán átültetés és retrovirális közvetítésű *in ovo* funkcionyerés alkalmazásával tanulmányoztuk az Shh szerepét a bélidegrendszer fejlődésében. Megállapítottuk, hogy a Hedgehog jelátvitel gátlása cyclopamine-val vagy funkcióblokkoló ellenanyaggal hyperganglionózishoz, míg a Shh túlzott kifejezése aganglionózishoz vezet. Az ENCC-k sikertelen kolonizációja a sejtek migrációjának, szaporodásának vagy differenciálódásának rendellenességéből származhat. Megállapítottuk, hogy a magas Shh koncentráció jelentősen csökkenti az ENCC proliferációt, és elősegíti azok idő előtti differenciálódását neuronokká. A Shh *in vivo* RCAS-retrovírus-közvetített kifejezése megerősíti ezeket az eredményeket; az embryóban disztális aganglionózist, valamint súlyos hypoganglionózist okozott a proximalis vastagbélben. Eredményeink megerősítik a korábbi megfigyeléseket és feltárják a Shh-jelátvitel alapvető szerepét az ENCC-k proliferációjának, differenciálódásának, migrációjának és mintázatának szabályozásában.

Megvizsgáltuk a Shh hozzáadásának és gátlásának hatását *ex vivo* és *in ovo*, és megfigyeltük, hogy a Shh aktivitás modulálása drámai változásokhoz vezet az ECM fehérjék expressziójában, amelyek a ganglionléc eredetű sejtek migrációjának ismert szabályozói. Míg a laminin, a fibronectin és a kollagén I támogatja a dúlcél eredetű sejtek migrációját (permisszív hatás), addig a chondroitin-szulfát proteoglikán típusú molekulák, beleértve a versicánt és a kollagén IX-et gátolják a migrációt. Megállapítottuk, hogy Shh indukálja a versican, a kollagén IX és a CS-56 expresszióját a bélben, míg a cyclopamine (Shh jelátvitelt blokkoló reagens) csökkenti.

4.7. Az ENCC-k extracelluláris mátrixot termelnek, hogy átalakítsák mikrokörnyezetüket és szabályozzák migrációjukat az ENS fejlődése során.

A bélidegrendszer fejlődése idején, amikor a vándorló ENCC-k belépnek a coecum területére, tenaszcin akkumuláció figyelhető meg az érkező sejtek körül. Ez a dinamikus expressziós mintázat arra utalhat, hogy a disztális bél kolonizációja folyamán a migráló ENCC-k átalakítják az extracelluláris mátrix környezetét. Ganglionmentes utóbelek chorioallantois membránon történő tenyésztésével megállapítottuk, hogy a tenaszcin-expresszió hiányzik, különösen a submucosalis régióban, ami felveti azt a lehetőséget, hogy az ENCC-k tenaszcsint termelnek, vagy indukálják annak mesenchymális expresszióját. Korai embryóból izolált velőcső tenyészetekkel és testüreg kimérák alkalmazásával azt találtuk, hogy amikor madár-ENCC-k kolonizálják az aneurális patkány-graftot akkor csirke eredetű tenaszcsint fejeznek ki, ami kísérletesen bizonyítja, hogy az ENCC-k tenaszcsint termelnek.

Ahhoz, hogy megértsük az ENCC-k bél mesenchymára gyakorolt hatását, ganglionmentes utóbeleket állítottunk elő *in vivo* vagus régió velőcső ablációjával és *ex vivo* chorioallantois membrán graftok alkalmazásával. Mindkét embryomanipulációs modell esetében, a ganglionmentes utóbél ECM mintázatában határozott különbség mutatkozott a kontroll állatokéhoz képest, csökkent tenaszcin expresszió jellemezte a submucosalis régiót. Ez arra utal, hogy míg a külső bélfal képes saját tenaszcsint előállítani, ami valószínűleg a simaizomsejtekből származik, addig a belső mesenchyma tenaszcin expressziója függ az ENCC-k jelenlététől a submucosa területén. Az ENCC-k tehát nem csak reagálnak mikrokörnyezetükre, hanem módosítják is azt az ECM expressziójának modulálásával.

Extracelluláris mátrixot célzó kísérleti munkánk második részében részletesebben karakterizáltuk a vándorló ENCC-k és az extracelluláris mikrokörnyezet közötti kölcsönhatást. A különböző fejlődési stádiumok ECM mintázatának immunhisztokémiai összehasonlítása során több olyan heparán-szulfát proteoglikán fehérjét (HSPG) találtunk, amelyek intenzíven

expresszálódnak a fejlődő bélidegrendszerben. Kimutattuk, hogy a korai embryóban vándorló ENCC-k közvetlen környezete intenzív kollagén XVIII és agrin expressziót mutatott. A kollagén XVIII volt az első olyan molekula a kollagének közül, amelyről kimutatták, hogy heparán-szulfát oldalláncokkal rendelkezik. Kimutattuk, hogy mindkét fehérje körbefogja a kifejlett ganglionokat, így szerepet játszhatnak egy fizikai gát létrehozásában, amely elválasztja a ganglionokat a simaizomtól, kapillárisoktól és egyéb környező sejtektől, potenciálisan megvédve a különböző immunmediátor molekuláktól is.

Igazoltuk, hogy az EDNRB-/- egerek proximális, bélidegrendszer tartalmazó vastagbete erős kollagén XVIII expressziót mutat az enterális ganglionok és az ezeket egymással összekötő rostok körül. Ezzel szemben, a ganglionmentes disztális vastagbélben nincs kollagén XVIII expresszió. Az agrin ganglionok körüli expressziója szintén hiányzik a ganglionmentes szakaszban. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az ENCC-k szükségesek a kollagén XVIII és az agrin enterális ganglionokhoz asszociált expressziójához.

Az embryomanipulációval kapott eredmények azt mutatják, hogy az ENCC-k maguk is termelnek kollagén XVIII-at és agrint, perlekánt viszont nem expresszálnak. Amikor E11.5 egér utóbelét átültettünk E3 csirke embryo primitív testüregébe a graftot a fogadó embryoból származó ganglionléc-eredetű sejtek kolonizálják és endothelsejtek vaszkularizálják. A madár specifikus kollagén XVIII, az agrin és a perlecan ellenanyagok alkalmazása igazolta, hogy a HSPG típusú ECM molekulákat csirkéből származó sejtek termelik.

In vitro sejtenyészetek kettős immunfluoreszcens festése igazolta, hogy a PLP1+ gliasejtek kollagén XVIII-at és agrint is expresszálnak, míg a Tau+ enterális neuronok csak agrint termelnek. Az agrin és kollagén XVIII ENCC-kre kifejtett hatását *in vitro* sejt migrációs (stripe-choice assay) kísérletekben is megvizsgáltuk. Kísérleteinkben E7 embryokból izolált középbelet GDNF jelenlétében egy olyan felszínen tenyésztettük, amelyre előzetesen váltakozó sávokban különböző ECM fehérjéket vittünk fel. A kollagén XVIII-at rekombináns endostatinnal helyettesítettük, mivel a kollagén XVIII fehérje tisztított formában a kereskedelemben nem elérhető. A tenyésztett ENCC-k intenzíven vándoroltak az endostatinnal, valamint az endostatinnal és az fibronektinnel, illetve lamininnel együtt bevont sávokon. A sejt vándorlást megengedő endostatinnal szemben az agrin gátolta az ENCC-k vándorlását.

Az ENCC-k azon szerepének megismerése, hogy aktívan képesek mátrix környezetük megváltoztatására fontos terápiás és klinikai lehetőségeket tár fel. A Hirschsprung betegség esetében például, az aganglionotikus bélszakaszban nemcsak az ENCC-k hiányával állunk szemben, hanem az ECM hálózat kialakulása is zavart szenved. Az EDNRB mutáns egerek disztális vastagbélinek periganglionikus régiójában hiányzik a kollagén XVIII és az agrin. A Hirschsprung betegség okait és hatásait tehát sokkal kiterjedtebb körben kell vizsgálni, a bél fejlődésének és struktúrájának kialakulása során. A regeneratív terápiában, ahol a Hirschsprung betegség során megjelenő aganglionotikus bélszakasz őssejtes repopulációját célozzák meg, számolni kell azzal is, hogy a sejtek egy olyan abnormális mátrix közegbe kerülnek, amely potenciális változásokat okozhat az enterális neuronális fejlődésben a megváltozott mikrokönyezet hatására. Az agrin expresszió és ezáltal a sejt migrációt gátló hatás csökkentése, illetve a sejt migrációt serkentő faktorok előtérbe helyezése, mint a kollagén XVIII és a tenascin, olyan új lehetőségeket kínálnak, amelyek a neurális őssejtek migrációját biztosíthatják a transzplantációt követően. Ehhez azonban további kísérletek szükségesek az ECM funkcionális, normál és patológiás bélidegrendszer fejlődésre kifejtett szerepének meghatározására.

V. A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI:

1.) A ganglionléc-eredetű sejtek fejlődésének részletes immuncitokémiai karakterizálását embryomanipulációs módszerrel ötvözve (velőcső transzplantáció) kísérletesen is meghatároztuk a velőcső vagus szakaszából kivándorló ganglionléc eredetű őssejtek vándorlási útját és utóbélben történő differenciálódását.

2.) Embryomanipulációs kísérletekkel igazoltuk, hogy a sacralis eredetű sejtek először a plexus pelvicus ganglionjait hozzák létre, majd tovább vándorolnak és a distalis vastagbélben a plexus myentericus létrehozásában vesznek részt.

3.) Az Endothelin-3 receptora (EDNRB) a ganglionléc sejteken fejeződik ki, míg a coecum és a vastagbél mesenchymája - hasonlóan a GDNF-hez - az Endothelin-3 növekedési faktort expresszálja. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az Endothelin-3 serkenti a ganglionléc sejtek proliferációját, gátolja a GDNF indukált differenciálódást, ezáltal biztosítva a ganglionléc sejtek vastagbélbe való bevándorlását.

4.) Csirke-fürj-, csirke-egér bélkimérák előállításával olyan új embryomanipulációs technikát vezettünk be, amellyel vizsgálni lehet a bélidegrendszer fejlődésének hátterében álló folyamatokat. A bélkimérák újabb molekulák (Sonic hedgehog, BMP-4, Wnt-11, CXCL12 növekedési faktorok) bélidegrendszer fejlődésben betöltött szerepének tanulmányozását indították el.

5.) Kimutattuk, hogy a zebrahal, madár és humán embryok gasztrointesztinális rendszerében a ganglionléc eredetű sejtek vándorlása, differenciálódása az endothél sejtek felszínén történik. A bélfal endothélsejtjei a vándorló ganglionléc sejtek osztódását stimulálják. Az enterális erek koncentrikus rétegeinek kialakulása megelőzte a ganglionléc sejtek bélcsőben történő haladását. Az enterális ganglionléc sejtek beta-1 integrin molekulákkal kapcsolódva vándorolnak a két koncentrikus rétegben fejlődő érhálózat basális membránján.

6.) Embryomanipulációs kísérlettel és *in vitro* szervtenyészetben igazoltuk, hogy a tunica muscularis izomrétege biztosítja, hogy az enterális plexusok koncentrikusan a bél külső rétegében, a körkörös simaizomréteg belső és külső felszínén helyezkedjenek el.

7.) Eredményeink igazolják, hogy a bél epitheliumból származó Shh növekedési faktor koncentrációgradiense a lamina propriaiban olyan gátló ECM környezetet hoz létre, amely megakadályozza, hogy az ENCC-k az epithelium közelébe vándoroljanak, ellentétben a szintén epitheliumból származó Netrin molekula chemoattraktív hatásával, és ezáltal kijelöli a plexus submucosus leendő helyét.

8.) Embryomanipulációs módszerekkel, transzgenikus állatok embryoinak alkalmazásával, őssejt-, és szervtenyészetekben kimutattuk, hogy az enterális ganglionléc eredetű sejtek tenascin-C, agrin és kollagén XVIII típusú extracelluláris mátrixot termelnek, hogy átalakítsák mikrokörnyezetüket és elősegítsék migrációjukat a bélidegrendszer fejlődése során.

VI. CÍMLAPFOTÓK:

Az elmúlt néhány évben publikált bélidegrendszer embryonális fejlődését célzó kutatásokból született első és utolsó-szerzős cikkeimből számos kép az újságok címlapjára került (Goldstein és Nagy 2008; Nagy és mtsai., 2009; Nagy és mtsai., 2010, 2012, 2016; Nagy és Goldstein, 2017; Dóra és mtsai., 2017, 2018).



VII. Az eredmények gyakorlati hasznosulásának lehetőségei

Kutatócsoportom együttműködve a bostoni Harvard Egyetem Gyermeksebészeti Tanszékével azt tűzte ki célul, hogy karakterizálja a normál és a Hirschsprung-kórra jellemző rendellenes bélidegrendszer embryonális 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. Az RNAseq és embryomanipulációs kísérletekkel számos, korábban ismeretlen molekulát azonosíthatunk a fejlődő bélidegrendszer környezetében. Sejtszintű RNSseq analízis fényt deríthet azokra a génekre, amelyek az ENCC-k invazivitását szabályozzák. Mindezek alapján olyan molekuláris stratégiákat dolgozhatunk ki, amelyekkel fokozni lehet a biopsziákból kinyert vagy őssejtekből differenciáltatott idegi őssejtek migrációs és integrációs képességét a posztnatális bélbe történő transzplantáció után.

VIII. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE:

8.1. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK: (IF: impakt faktor)

1. **Nagy, N.**, Barad, C., Hotta, R., Bhave, S., Arciero, E., Dora, D., & Goldstein, A. M. (2018). Collagen 18 and agrin are secreted by neural crest cells to remodel their microenvironment and regulate their migration during enteric nervous system development. *Development*, 145(9), dev160317.
IF: 5,763
2. Graham, H. K., Maina, I., Goldstein, A. M., & **Nagy, N.** (2017). Intestinal smooth muscle is required for patterning the enteric nervous system. *Journal of Anatomy*, 230: 567–574.
IF: 2,479
3. **Nagy, N.**, & Goldstein, A. M. (2017). Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 66: 94–106.
IF: 6,138
4. **Nagy N.**, Barad C, Graham HK, Hotta, R., Cheng, L. S., Fejszak, N., & Goldstein, A. M. (2016). Sonic hedgehog controls enteric nervous system development by patterning the extracellular matrix. *Development*, 143: 264-275.
IF: 5,843
5. **(társ-elsőszerző)**. Akbareian, S. E., **Nagy, N.**, Steiger, C. E., Mably, J. D., Miller, S. A., Hotta, R., Molnar, D., & Goldstein, A. M. (2013). Enteric neural crest-derived cells promote their migration by modifying their microenvironment through tenascin-C production. *Developmental Biology*, 382: 446–456.
IF: 3,637
6. **Nagy, N.**, Burns, A. J., & Goldstein, A. M. (2012). Immunophenotypic characterization of enteric neural crest cells in the developing avian colorectum. *Developmental Dynamics*, 241(5), 842–851.
IF: 2,59
7. **Nagy N.**, Olive Mwizerwa, Karina Yaniv, Liran Carmel, Rafael Pieretti-Vanmarcke, Brant M Weinstein, Goldstein AM (2009). Endothelial cells promote migration and proliferation of enteric neural crest cells via β 1 integrin signaling. *Developmental Biology*. 330: 263-72.
IF: 4,379
8. Goldstein AM, **Nagy N.** (2008). A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo: Avian model for studying ENS development. *Pediatric Research*. 64: 326-33.
IF: 2,604
9. **Nagy N.**, Brewer KC, Mwizerwa O, Goldstein AM. (2007). Plexus pelvici contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. *Developmental Dynamics*. 236: 73-83.
IF: 3,084
10. **Nagy N.**, Goldstein AM. (2006). Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Developmental Biology*. 293: 203-17.
IF: 4,893
11. **Nagy N.**, Goldstein AM. (2006). Intestinal coelomic transplants: a novel method for studying enteric nervous system development. *Cell and Tissue Research*. 326: 43-55.
IF: 2,58

8.2. Az értekezés kutatási témájához (bélidegrendszer embryonális fejlődése) közvetlenül kapcsolódó egyéb tudományos közlemények:

Nagy N, Richard A. Guyer, Ryo Hotta, Dongcheng Zhang, Donald F. Newgreen, Viktoria Halasy, Tamas Kovacs, and Goldstein AM (2020). RET overactivation leads to concurrent Hirschsprung disease and intestinal ganglioneuromas. *Development (accepted, in press)*

IF: 5,611

Nagy, N., Marsiano, N., Bruckner, R. S., Scharl, M., Gutnick, M. J., Yagel, S., Arciero, E., Goldstein, A. M., & Shpigel, N. Y. (2018). Xenotransplantation of human intestine into mouse abdomen or subcutaneous tissue: Novel platforms for the study of the human enteric nervous system. *Neurogastroenterology and motility*, 30(3), 10.1111/nmo.13212. <https://doi.org/10.1111/nmo.13212>

IF: 3,803

Dóra, 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*, 233(4), 401–410.

IF: 2,638

Zhang, D., Rollo, B. N., **Nagy, N.**, Stamp, L., & Newgreen, D. F. (2019). The enteric neural crest progressively loses capacity to form enteric nervous system. *Developmental Biology*, 446(1), 34–42.

IF: 2,895

Nissim-Eliraz, E., Nir, E., Shoval, I., Marsiano, N., Nissan, I., Shemesh, H., **Nagy, N.**, Goldstein, A. M., Gutnick, M., Rosenshine, I., Yagel, S., & Shpigel, N. Y. (2017). Type Three Secretion System-Dependent Microvascular Thrombosis and Ischemic Enteritis in Human Gut Xenografts Infected with Enteropathogenic Escherichia coli. *Infection and immunity*, 85(11), e00558-17.

IF: 3,256

Belkind-Gerson, J., Graham, H. K., Reynolds, J., Hotta, R., **Nagy, N.**, Cheng, L., Kamionek, M., Shi, H. N., Aherne, C. M., & Goldstein, A. M. (2017). Colitis promotes neuronal differentiation of Sox2+ and PLP1+ enteric cells. *Scientific Reports*, 7(1), 2525. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02890-y>

IF: 4,122

(Corresponding author) Cheng LS., R Hotta, H K. Graham, J Belkind-Gerson, **N Nagy**, AM. Goldstein. (2016). Postnatal human enteric neuronal progenitors can migrate, differentiate, and proliferate in embryonic and postnatal aganglionic gut environments. *Pediatric Research* 81(5):838-846.

IF: 3,123

Cheng LS, Graham HK, Pan WH, **Nagy N**, Carreon-Rodriguez A, Goldstein AM, Hotta R. (2016). Optimizing neurogenic potential of enteric neurospheres for treatment of neurointestinal diseases. *J Surgery Research*. 2016 Dec;206(2):451-459.

IF: 2,198

Hotta R; Cheng L, Graham H; **N Nagy**, J Belkind-Gerson, G Mattheolabakis, Mr M Amiji; AM Goldstein. (2016). Delivery of enteric neural progenitors with 5-HT4 agonist-loaded nanoparticles and thermosensitive hydrogel enhances cell proliferation and differentiation following transplantation *in vivo*. *Biomaterials*: 88:1-11.

IF: 8,402

Belkind-Gerson J, Hotta R, Whalen M, Nayyar N, **Nagy N**, Cheng L, Zuckerman A, Goldstein AM, Dietrich J. (2016). Engraftment of enteric neural progenitor cells into the injured adult brain. *BMC Neuroscience* 17:5. doi: 10.1186/s12868-016-0238-y
IF: 2,312

Loscertales, M ; Nicolaou, F ; Jeanne, M ; Longoni, M ; Gould, DB ; Sun, YW ; Maalouf, FI ; Nagy, N ; Donahoe, PK Type IV collagen drives alveolar epithelial-endothelial association and the morphogenetic movements of septation. *BMC BIOLOGY* 14 Paper: 59 , 21 p. (2016)
IF: 6,779

Alan J. Burns, Allan M. Goldstein, Donald F. Newgreen, Lincon Stamp, Karl-Herbert Schafer, Marco Metzger, Ryo Hotta, Heather M. Young, Peter W. Andrews, Nikhil Thapar, Jaime Belkind-Gerson, Nadege Bondurand, Joel C. Bornstein, Wood Yee Chan, Kathy Cheah, Michael D. Gershon, Robert O. Heuckeroth, Robert M.W. Hofstra, Lothar Just, Raj P. Kapur, Sebastian K. King, Conor McCann, **Nandor Nagy**, Elly Ngan, Florian Obermayr, Vassilis Pachnis, Pankaj J. Pasricha, Mai Har Sham, Paul Tam, Pieter Vanden Berghe. White paper on guidelines concerning enteric nervous system stem cell therapy for enteric neuropathies. (2016). *Developmental Biology*, 417:229-51
IF: 2,944

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.* Apr;28(4):498-512.
IF:3,617

Loscertales M, Nicolaou F, Jeanne M, Longoni M, Gould DB, Sun Y, Maalouf FI, **Nagy N**, Donahoe PK. (2016). Type IV collagen drives alveolar epithelial-endothelial association and the morphogenetic movements of septation. *BMC Biology*. Jul 13;14:59. doi: 10.1186/s12915-016-0281-2.
IF: 6,779

Belkind-Gerson J, Hotta R, **Nagy N**, Thomas AR, Graham H, Cheng L, Solorzano J, Nguyen D, Kamionek M, Dietrich J, Cherayil BJ, Goldstein AM. (2015). Colitis induces enteric neurogenesis through a 5-HT4-dependent mechanism. *Inflammatory Bowel Diseases* 21:(4) pp. 870-878.
IF: 4,358

Cheng LS, Hotta R, Graham HK, **Nagy N**, Goldstein AM, Belkind-Gerson J. (2016). Endoscopic delivery of enteric neural stem cells to treat Hirschsprung disease. *Neurogastroenterology & Motility*.27:(10) pp. 1509-1514.
IF: 3,31

Schill EM, Lake JJ, Tusheva OA, **Nagy N**, Bery SK, Foster L, Avetisyan M, Johnson SL, Stenson WF, Goldstein AM, Heuckeroth RO. (2015). Ibuprofen slows migration and inhibits bowel colonization by enteric nervous system precursors in zebrafish, chick and mouse. *Developmental Biology* 409(2):473-88
IF: 2,944

Badizadegan K, Thomas AR, **Nagy N**, Ndishabandi D, Miller SA, Alessandrini A, Belkind-Gerson J, Goldstein AM. (2014). Presence of intramucosal neuroglial cells in normal and aganglionic human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 307:(10) pp. G1002-G1012.
IF: 3,798

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

IF: 3.424

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, *Developmental Dynamics*. 240: (6) 1402-1411.

IF: 2.536

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. *Mechanism of Development*. 122(6): 821-833.

IF: 3,838

8.3. Egyéb idegennyelvű tudományos közlemények (nyirokszervek fejlődése):

Nagy, N., Busalt, F., Halasy, V., Kohn, M., Schmieder, S., Fejszak, N., Kaspers, B., & Härtle, S. (2020). In and Out of the Bursa-The Role of CXCR4 in Chicken B Cell Development. *Frontiers in Immunology*, 11, 1468. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01468>

IF: 5,085

Dóra D, Kovács T. **Nagy N** (2020). Az intestinalis macrophagok és az enterális idegrendszer szerepe a bél neuroimmunológiai kapcsolataiban. Alap kutatás és klinikai vonatkozások [The role of intestinal macrophages and the enteric nervous system in gut neuroimmunology. Basic science and clinical implications. *Orvosi Hetilap* 161: 19 pp. 771-779.

IF: 0,497

Jia, Xinkai; Gábris, Fanni; Jacobsen, Óli; Bedics, Gábor ; Botz, Bálint ; Helyes, Zsuzsanna ; Kellermayer, Zoltán ; Vojkovic, Dóra ; Berta, Gergely ; **Nagy, Nándor**, Zoltán . (2020). Foliate Lymphoid Aggregates as Novel Forms of Serous Lymphocyte Entry Sites of Peritoneal B Cells and High-Grade B Cell Lymphomas. *Journal of Immunology* 204: 1 pp. 23-36.

IF: 4,886

Bódi, I., H-Minkó, K., Prodán, Z., **Nagy, N.**, & Oláh, I. (2019). A thymus szerkezete a huszonegyedik század elején [Structure of the thymus at the beginning of the 21th century]. *Orvosi hetilap*, 160(5), 163–171.

IF: 0,497

Bódi, I., Felföldi, B., Minkó, K., Benyeda, Z., **Nagy, N.**, Kiss, A. L., Palya, V., & Oláh, I. (2019). Effect of IBDV infection on the interfollicular epithelium of chicken bursa of Fabricius. *Poultry science*, 98(9), 3464–3470.

IF: 2,659

Kugler, S., Nagy, N., Rácz, G., Tőkés, A. M., Dorogi, B., & Nemeskéri, Á. (2018). Presence of cardiomyocytes exhibiting Purkinje-type morphology and prominent connexin45 immunoreactivity in the myocardial sleeves of cardiac veins. *Heart rhythm*, 15(2), 258–264.

IF: 5,225

Dora D, Fejszak N, Goldstein AM, Minko 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(2):353-370.

IF: 3,043

Nagy N., Bodi I, Olah I. (2016). Avian dendritic cells: phenotype and ontogeny in lymphoid organs. *Developmental and Comparative Immunology*. 58:47-59.

IF: 3,218

Felföldi B, Magyar A, **Nagy N.**, Olah I, Pharr GT. (2017). Identification of the gene product recognized by monoclonal antibody GIIIF3. *Poultry Science*. 96(2):474-477.

IF: 2,216

Bódi I, Kocsis K, Benyeda Z, Fejszák N, Molnár D, **Nagy N.**, Oláh I. (2016). Dual secretion locations on type II cells in the avian lung suggest local as well as general roles of surfactant. *Journal of Morphology*. 277:1062-71.

IF: 1,655

Bodi I, Minko K, Molnar D, **Nagy N.**, Olah I. (2015). A novel aspect of the structure of the avian thymic medulla. *Cell and Tissue Reserach* 359: 489-501.

IF: 2,948

Olah I, **Nagy N.** (2013). Retrospection to discovery of bursal function and recognition of avian dendritic cells; past and present., *Developmental and Comparative Immunology*. 41:310-5.

IF: 3.705

Katz S, Balogh P, **Nagy N.**, L Kiss A. (2012). Epithelial-to-mesenchymal transition induced by Freund's adjuvant treatment in rat mesothelial cells: a morphological and immunocytochemical study, *Pathology and Oncology Research* 18: 641-649.

IF: 1.555

Kocsis, K ; Benyeda, Z ; Bodi, I ; Molnar, D ; **Nagy, N.** ; Fejszak, N ; Palya, V ; Olah, I. (2012) Chicken dendritic cells and type II pneumocytes express a common intracellular epitope. *BRITISH POULTRY SCIENCE* 53: 3 pp. 397-400.

IF: 1.147

Bíró, É., Kocsis, K., **Nagy, N.**, Molnár, D., Kabell, S., Palya V., Oláh, I. (2011). Origin of the chicken splenic reticular cells influences the effect of the infectious bursa disease virus (IBDV) on the extracellular matrix. *Avian Pathology*.

IF: 1,711

Nagy N., Oláh I. (2010). Experimental evidence for the ectodermal origin of the epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius. *Development*. 137: 3019-23.

IF: 6,898

Nagy N., Oláh I. (2009). Locally applied testosterone is a novel method to influence the development of the avian bursa of Fabricius. *Journal of Immunological Methods*. 343: 97-102. **IF: 2,1347**

(egyenlő társ-elsőszerző) Bódi I, **Nagy N.**, Lídia Sinka, Botond-Zoltán Igyártó, Imre Oláh (2009). Novel monoclonal antibodies recognize guinea fowl thrombocytes. *Acta Veterinaria Hungarica*. 57: 239-46.

IF: 0,642

Nóra Terényi, **Nándor Nagy**, Krisztián Papp, József Prechl, Imre Oláh, Anna Erdei (2009). Transient decompementation of mice delays onset of experimental autoimmune encephalitis and impairs MOG-specific T cell response and autoantibody production. *Molecular Immunology*. 47: 57-63
IF: 3,202

(egyenlő társ-elsőszerző) Igyártó BZ, **Nagy N**, Magyar A, Oláh I.(2008). Identification of the avian B-cell-specific Bu-1 alloantigen by a novel monoclonal antibody. *Poultry Science*. 87: 351-5. **IF: 1,668**

Nagy N, Olah I. (2007). Pyloric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken. *Journal of Anatomy*. 211: 407-11. **IF: 2,547**

Nagy N, Biro E, Takacs A, Polos M, Magyar A, Olah I. (2005). Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. *Developmental Dynamics*. 232: 55-66. **IF: 3,333**

Nagy N, Igyarto B, Magyar A, Gazdag E, Palya V, Olah I. (2005). Esophageal tonsil of the chicken. *Acta Veterinaria Hungarica*. 53: 173-188.
IF: 0,53

Nagy N, Magyar A, Toth M, Olah I. (2004). Quail as the chimeric counterpart of the chicken: Morphology and ontogeny of the bursa of Fabricius. *Journal of Morphology*. 259: 328-39. **IF: 1,528**

Nagy N, Magyar A, Toth M, Olah I. (2004). Origin of the bursal secretory dendritic cell. *Anatomy and Embryology*. 208: 97-107.
IF: 1,254

Gumati MK, Magyar A, **Nagy N**, Kurucz E, Felfoldi B, Olah I. (2003). Extracellular matrix of different composition supports the various splenic compartments of guinea fowl (*Numida meleagris*). *Cell and Tissue Research*. 312: 333-43.
IF: 2,991

Olah I, **Nagy N**, Magyar A, Palya V. (2003). Esophageal tonsil: a novel gut-associated lymphoid organ. *Poultry Science*. 82: 767-70.
IF: 1,253

Oláh I, Gumati KH, **Nagy N**, Magyar A, Kaspers B, Lillehoj H. (2002). Diverse expression the K-1 antigen by the cortico-medullary and reticular epithelial cells of the bursa of Fabricius in chicken and guinea fowl. *Developmental and Comparative Immunology*. 26: 481-8. **IF: 2,186**

Nagy N, Magyar A, Dávid A, Gumati MK, Oláh I. (2001). Development of the follicle-associated epithelium and the secretory dendritic cell in the bursa of Fabricius of the guinea fowl (*Numida meleagris*) studied by novel monoclonal antibodies. *Anatomical Record*. 262: 279-292.
IF:1,444

Nagy N, Magyar A, Oláh I. (2001). A novel monoclonal antibody identifies all avian embryonic myogenic cells and adult smooth muscle cells. *Anatomy and Embryology*. 204: 123-34.
IF:1,754

Oláh I, **Nagy N**, David C, Gumati MK, Magyar A. (2001). Ontogeny of the dendritic, and follicle-associated epithelial cells in the bursa of Fabricius of guinea fowl (*Numida meleagris*). *Ital J Anat Embryol*. 106 (2 suppl 1): 271-7.
IF:-

Iván J, **Nagy N**, Magyar A, Kacskovics I, Mészáros J. (2001). Functional restoration of the bursa of Fabricius following *in ovo* infectious bursal disease vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 79: 235-48.

IF: 1, 389

IX. Könyvfejezetek:

Olah I, Nagy N, Vervelde L. (2021). Structure of avian lymphoid system, in: Davison F; Kaspers B; Schat K A Avian Immunology. (in press)

Nagy N, Gobel T, Jaffredo T, (2021). Development of the Avian Immune System., in: Davison F; Kaspers B; Schat K A Avian Immunology. (in press)

Olah I, **Nagy N**, Vervelde L. (2013). Structure of avian lymphoid system, in: Davison F; Kaspers B; Schat K A Avian Immunology. (<https://www.elsevier.com/books/avian-immunology/schat/978-0-12-396965-1>)

Fellah J, Jaffredo T, **Nagy N**, Dunon D. (2013). Development of the Avian Immune System., in: Davison F; Kaspers B; Schat K A Avian Immunology. (<https://www.elsevier.com/books/avian-immunology/schat/978-0-12-396965-1>)

J. Iván, **N. Nagy**, I. Oláh, I. Kacskovics (2001). Influence of IBDV immune complex vaccine administrated *in ovo* on the expression of Chb1 gene. *Immunosuppressive viral disease in poultry*. Edited by F. Coudert, R. Mulder and T. van den Berg. Luxemburg. 233-242.

M.K. Gumati, **N. Nagy**, A. Magyar, I. Oláh (2001). What means bursa-dependency of the periellipsoidal white pulp in the avian spleen. *Current Progress on Avian Immunology Research*. Edited by K. A. Schat. Itchaca, NY. 131-136.

A. Magyar, **N. Nagy**, M.K. Gumati, I. Oláh (2001). K1 antigen expression in normal and immunosuppressed birds. *Current Progress on Avian Immunology Research*. Edited by K. A. Schat. Itchaca, NY. 137-143.

Oláh I., Magyar A., **Nagy N.**, Horváth E., Kovács A., Nagy E. (2001). Effect of IBDV infection on the secretory dendritic cells. EU Cost Action 839: International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia. 329-340.

9.1. Magyar nyelvű közlemények jegyzéke:

Nagy Nándor (1998). Apáthy Istvánról és a kolozsvári Állattani Intézetéről. *Collegium Biologicum*, vol. 2., 91-96.

Nagy Nándor (2009). Apáthy István. *Semmelweis Egyetem, X évfolyam, 3. szám. 15. oldal*

X. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:

Köszönöm Dr Allan Goldstein-nek a bostoni Harvard Egyetem tanszékvezető professzorának, hogy 2004-ben meghívott a laboratóriumába. Azóta 2-3 éves megszakításokkal 2017-ig közel 6 évet töltöttem az intézetében. Együtt kezdtük el a bélidegrendszer fejlődését célzó kutatásokat, amiből eddig 37 publikáció született.

Köszönettel tartozom Prof. Oláh Imre és Prof. Szél Ágoston intézetigazgatóknak, akik lehetővé tették, hogy a Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetben (2016 után Anatómiai, Szövet és Fejlődéstani Intézet) zavartalan környezetben tudjak dolgozni, mindig hálás leszek önzetlen anyagi és szakmai támogatásukért és a bátorító szavakért.

Köszönetnyilvánításomban még egyszer külön kiemelem Prof. Oláh Imre egyetemi tanárt, aki emberileg is legmesszemenőkig támogattott és már a PhD évek kezdetén témavezetőként ráállított a „jövő tudományára” az őssejtekre és a fejlődésbiológiára.

Köszönet Dr Magyar Attilának, aki kezdetben az ELTE gödi kutatóállomásán, majd a Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézetben tudományos diákkörösnek felfogadott, „megfertőzött” a kísérletes embryológiával és megtanított a szakma alapjaira.

Köszönöm jelenlegi és korábbi PhD hallgatóimnak, Dr. Dóra Dávidnak, Dr. Barad Csillának, Dr. Molnár Dávidnak, Kovács Tamásnak, Halasy Viktóriának és Fejszák Nórának, hogy nagy elhivatással segítették a munkámat, együtt dolgoztak velem és tudományos diákkörös munkájukat doktorandusz hallgatóként is folytatták. Köszönet a többi TDK hallgatónak: Bíró Éva (SOTE), Bódi Ildikó (ELTE), Csikós Gergely (SOTE), Harmati Petra (Babes-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár), Ivy Maina (University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, USA), Kugler Szilvia (SOTE), Lackó Erzsébet (ELTE), Molnár Attila (SOTE), Molnár Dávid (SOTE), Pásti Kamilla (SOTE), Pethő Csongor (Babes-Bolyai Tudományegyetem), Pintér Tamás és Újvári Fruzsina (SOTE), Pólos Miklós (SOTE), Olaithan Ijtimelin (SOTE), Putnoki-Csicsó Zoltán (Marosvásárhelyi Orvosegyetem), Sinka Lídia (SOTE), Sóos Ádám (ELTE), Szőcs Emőke (ELTE), Takács Ágnes (SOTE), hogy roppant lelkesedéssel és hittel részt vettek ebben a munkában.

Továbbá, hálával tartozom a munkacsoportom valamennyi jelenlegi és egykori munkatársának Dr. Kocsis Katalinnak, Dr. Herberth-Minkó Krisztinának, Dr. Bódi Ildikónak, Dr. Kittner Zsuzsának, Dr. Igyártó Botondnak (USA), Dr. Hajdú Zoltánnak (USA), Felföldi Balásznak, Fügedi Jutkának, Orbán Editnek, Fölker Orsolyának, Vidra Györgynének, Orbán Lilinek és Csenkey Anikónak, hogy végig segítségemre voltak a kutatási és oktatási feladataim elvégzése során.

Köszönöm az Anatómiai Intézet munkatársainak a barátságos, támogató környezetet és a szakmai segítséget.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönettel tartozom családomnak, amiért munkám során mindvégig mellettem álltak, feleségemnek, Bardócz Orsolyának, hogy mindent félretéve 3 gyerekünk mellé azt is vállalta, hogy a doktori disszertáció megírásához szükséges eredményekért a tudományos és a való világot keresztül-kasul velem beutazza.

RÖVID TUDOMÁNYOS ÖNÉLETRAJZ

- Dr. Nagy Nándor -

Munkahely:

- habilitált egyetemi docens, Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet-, és Fejlődéstani Intézet, Budapest, Magyarország

-Munkahelyi cím: Tűzoltó u. 58., 1094 Budapest, Magyarország

-Munkahelyi telefon: +36-1-2156920, belső: 53613

-E-mail: nagy.nandor@med.semmelweis-univ.hu

I. Tanulmányok:

-1997: egyetemi tanulmányok, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár. Szakdolgozat címe: *Patkány monoklonális ellenanyagok előállítása egér embrionális őssejtek differenciáltsági állapotának meghatározására*. Témavezető: Dr. Magyar Attila (Semmelweis Egyetem).

-1997-2001: nappali doktori képzés, Semmelweis Egyetem, Doktori Iskola, Budapest, Magyarország. Értekezés címe: *A bursa Fabricii stromális elemeinek differenciálódása*. Témavezető: Prof. Oláh Imre (Semmelweis Egyetem)

-2001-2008: egyetemi tanársegéd, Semmelweis Egyetem, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet, Budapest, Magyarország.

-2004-2006: posztdoktori állás, Harvard Medical School, MGH, Department of Pediatric Surgery, Dr. Allan M. Goldstein labor, téma: *A bél idegrendszer fejlődésbiológiája a madár, zebrahal és emlős embryokban*, Boston, USA.

-2008-2014: egyetemi adjunktus, Semmelweis Egyetem, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet, Budapest, Magyarország.

-2011. **habilitáció**. Szakterület: *embryologia; fejlődésbiológia* (Semmelweis Egyetem)

-2014-: **egyetemi docens**, Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövettan és Fejlődéstani Intézet, Budapest, Magyarország

II. Tanulmányutak:

1995 (3 hónap) **Semmelweis Egyetem, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet, Fejlődésbiológiai Laboratórium**
támogató: Határon túli Magyarok Hivatala
tevékenység, téma: egér őssejtek tenyésztése, blasztula injektálás, micromanipulációs módszerek

1996 (4 hónap) **Semmelweis Egyetem, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet, Fejlődésbiológiai Laboratórium**
támogató: Határon túli Magyarok Hivatala
tevékenység, téma: monoklonális ellenanyagok előállítása egér embryonális őssejtek ellen

1997 (3 hónap) **Semmelweis Egyetem**
támogató: Semmelweis Egyetem

tevékenység, téma: sejttenyésztési módszerek, elektronmikroszkópia

2000 (3 hónap) **Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Anatómia és Fejlődésbiológia Intézet**

támogató: ERASMUS

tevékenység, téma: madárembryokon végzett mikroszsebészeti technikák: gerinchúr abláció technikája, kiméra, parabiosis

2004-2006 (24 hónap) **Harvard Medical School, MGH, Department of Pediatric Surgery, posztdoktori kutató**

támogató: Harvard Medical School

tevékenység, téma: A bélidegrendszer fejlődésbiológiája madár, zebrahal és emlős embryokban.

2009 (3 hónap) **Harvard Medical School, MGH, Department of Pediatric Surgery, research fellow**

támogató: Harvard Medical School

tevékenység, téma: Sonic hedgehog növekedési faktor szerepe a béltraktus fejlődésében. Génmódosítás RCAS-retrovírus alapú módszerrel madár embryóban.

2011 (5 hónap) **Harvard Medical School, MGH, Department of Pediatric Surgery, research fellow EMBO Fellowship**

támogató: Harvard Medical School

tevékenység, téma: Génmódosítás siRNS-RCAS-retrovírus alapú módszerrel madár embryóban. Tenascin szerepe a bélidegrendszer fejlődésében

2014-2017 (36 hónap) **Harvard Medical School, MGH, Department of Pediatric Surgery, visiting professor**

támogató: Harvard Medical School

tevékenység, téma: extracelluláris mátrix, egér és humán szöveti össejtek manipulációja, szövetépítés, RNAseq

III. Kutatási téma:

-Össejtek (idegi-, és hemopoietikus) intraembryonális differenciálódása, gasztrointesztinális rendszer fejlődése: bélidegrendszer és a bélhez-asszociált nyirokszervek fejlődésbiológiája
-kutatási tapasztalat: embryomanipuláció, chimera-készítés és össejtek sorstérképezése, hisztológia (lektin és immun), elektronmikroszkópia, fagyasztott félvékony, *in situ* hibridizáció, elektroporáció, retrovírusos génbevétel, monoklonális ellenanyag technika, össejt-, szövet és szervtenyésztés, embryonális és felnőtt szervek decellularizációja (extracelluláris mátrix „scaffold”), epithelialis és neurális organoidok készítése.

IV. Szakmai elismerések (jelentős ösztöndíjak, tudományos kitüntetések):

2000 Student Travel Award

adományozó: Society for Developmental Biology. USA

elismert teljesítmény: konferencia absztrakt

2001 Apáthy István Díj

adományozó: Apáthy István Alapítvány

elismert teljesítmény: embryomanipuláció

2001 Student Travel Award

adományozó: Society for Developmental Biology. USA

elismert teljesítmény: konferencia absztrakt

2002 Lenhossék Díj

adományozó: Magyar Anatómus Társaság
elismert teljesítmény: legjobb morfológiai közlemény-2001

2004 Student Travel Award

adományozó: Society for Developmental Biology, USA
elismert teljesítmény: konferencia absztrakt

2009 Kiváló Tudományos Diákköri Nevelő

adományozó: Semmelweis Egyetem
elismert teljesítmény: TDK hallgatók oktatása

2010-2013 Bolyai Kutatási Ösztöndíj

adományozó: Magyar Tudományos Akadémia
elismert teljesítmény: Hám-mesenchyma kölcsönhatások szerepe a bélidegrendszer fejlődésében

2010 Tudomány képekben

adományozó: Magyar Tudományos Akadémia
elismert teljesítmény: Első helyezés

2011 EMBO Short Term Fellowship

adományozó: EMBO, Heidelberg, Germany
elismert teljesítmény: A sonic hedgehog növekedési faktor szerepe a bélidegrendszer fejlődése során

2013 Apáthy Díj

adományozó: Babes-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár
elismert teljesítmény: a magyar nyelvű biológia és ökológia szakképzésében vállalt oktató munkáért

2016-2020 Bolyai Kutatási Ösztöndíj

adományozó: Magyar Tudományos Akadémia
elismert teljesítmény: Extracelluláris mátrix szerepe a fejlődő bélidegrendszerben

2018 Bolyai+ Felsőoktatási Fiatal Oktatói, Kutatói Ösztöndíj

adományozó: UNKP
elismert teljesítmény: Idegi őssejtek és az extracelluláris mikrokörnyezet kölcsönhatása a bélidegrendszer normális és patológias fejlődésében

2019 Bolyai+ Felsőoktatási Fiatal Oktatói, Kutatói Ösztöndíj

adományozó: UNKP
elismert teljesítmény: Bélidegrendszeri őssejtek karakterizálása molekuláris és embryomanipulációs módszerekkel

2020 Kiváló Tudományos Diákköri Nevelő

adományozó: Semmelweis Egyetem
elismert teljesítmény: TDK hallgatók oktatása

V. Nemzetközi és hazai konferencia szervezés:

2007 --*szervező:* XIX Int. Symposium of Morphological Sciences meeting, Budapest

2010 --*szervező:* XI Avian Immunology Research Group meeting, Budapest

2018 --*szervezőbizottsági tag:* 5th International Symposium on Enteric Nervous System, április, 2018, Boston, USA

2019 --*szimpózium szervező (Őssejt és Embrió):* FAMÉ2019 konferencia, június, Budapest

2019 --*szervezőbizottsági tag:* Sejt, Fejlődés-, és Őssejtbiológusok Évi találkozója, Gödöllő

2022--*szervezőbizottsági tag:* 6th International Symposium on Enteric Nervous System, április, 2022, Ferrara, Italy

Tudományos közéleti tevékenység

- 1999 - 2003 EU COST Action 939, tag
 1999 - Society for Developmental Biology USA, tag
 2000 - American Society of Anatomy USA, tag
 2001 - Magyar Biológus Társaság, tag
 2007 - 2007 szervező: XIX International Symposium of Morphological Sciences meeting, Budapest
 2007 - International Society of Morphological Sciences, vezetőségi tag
 2009 - 2013 Magyar Anatómus Társaság, vezetőségi tag
 Sejt, Fejlődés-, és Össejtbiológusok Évi találkozója
 2019 Magyar Genetikusok Társasága, Sejt, Fejlődés-, és Össejtbiológusok Tagozat, vezetőségi tag
 2010 - 2010 szervező: XI Avian Immunology Research Group meeting, Budapest
 2012 - 2017 FA COST Action FA1207 Towards Control of Avian Coronaviruses: Strategies for Diagnosis, Surveillance and Vaccination, helyettes vezetőségi tag (Hungary)

Pályázatok rendszeres bírálata: OTKA/NFKI (HU), STIA (HU, Semmelweis University), Research for Hirschsprung Disease Foundation (USA), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Canada), CELSA (Belgium), STIA Semmelweis (HU), National Science Center (Poland), Forerunner Federation (USA).

VI. Oktatás (magyar, angol nyelven rendszeres gyakorlatvezetés, előadások):

1. AOK hallgatóknak: Makroszkópos anatómia, szövettan, fejlődésbiológia és neuroanatómia előadás és gyakorlat I. és II. éves medikus hallgatók részére (alapképzés).

2. Fejlődésbiológia I-II (magyar, angol), amely alapképzésben kötelezően választható tárgyként szerepel:

Fejlődésbiológia I félév, Össejtek: 10-12 óra előadás/ félév; II félév, Organogenezis: 10-12 óra előadás/ félév

Az össejtek karakterizálásával és az embryomanipulációs technikáknak alkalmazásával több, mint másfél évtizede, hogy tudományos szakdolgozatok, rektori pályaművek témavezetőjeként irányítom a laboratóriumban dolgozó hallgatók munkáját. TDK hallgatóim munkájának elismeréseként a Semmelweis Egyetem TDK konferenciáin, valamint OTDK konferenciákon 30 alkalommal nyertek valamilyen díjazást. A jelenlegi PhD hallgatóknak korábban TDK témavezetőként is én irányítottam a tudományos munkáját. Kétszer (2009, 2020) kaptam meg a Semmelweis Egyetem Kiváló Diákkörös Oktatója címet.

Foglalkoztatott TDK-sok száma összesen:**27**

TDK Konferenciákon elnyert díjak száma:

I. díj: **9** db; II. díj **11** db. III. díj és Rektori dicséret **6** db

Végzett Ph.D. hallgatók (név szerint) :

Dr. Dóra Dávid (2018), Dr. Barad Csilla (2019)

Jelenlegi Ph.D. hallgatók (név szerint) :

Halasy Viktória (2018-), Fejszák Nóra, Kovács Tamás (2019-)

VII. PhD képzés

-Programvezető: Embryológia, elméleti, kísérletes és klinikai fejlődésbiológia

-Fejlődésbiológia PhD kurzus (kurzusvezető: Dr Nagy Nándor)

I félév, Össejtek: 10-12 óra előadás/ félév

II félév, Organogenezis: 10-12 óra előadás/ félév

-Állatkísérletek PhD kurzus (kurzusvezető: Dr Szabó Györgyi)

2 óra előadás/kurzus

-Klinikai Embryológia PhD-kurzus (kurzusvezető: Dr Fancsovits Péter)

-2 óra előadás/kurzus

VIII. Nemzetközi kapcsolatok és konkrét témája:

Prof. Allan M. Goldstein, Department of Pediatric Surgery, MHG, Harvard Medical School, Boston; Téma: A Hirschsprung-kór fejlődésbiológiai hátterének tanulmányozása madár, zebrahal és humán embryokban.

Dr Maria Loscertales, Prof. Patricia K. Donahoe. Harvard Medical School. Téma: Extracelluláris mátrix szerepe a fejlődő tüdőben.

Dr. Jaimie Belkin-Gerson, Gastroenterology Unit, Colorado University, USA; Téma: A béltraktus organogenezisében közrejátszó homeobox gének vizsgálata.

Dr. Alan Burns, UCL-Institute of Child Health, London, UK; Téma: Ganglionléc sejtek differenciálódása humán embryóban és *Talpid3* mutáns csirke és égtörzsben.

Dr Sonja Hartle, Prof. Bernd Kaspers. Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Munich, Germany; Téma: A CXCR4 és SDF-1 jelátvitel szerepe a lép, bursa Fabricii és a vastagbél-cloaca embryonális fejlődése során.

Dr. Thierry Jaffredo, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France; Téma: A korai vérképző össejtek differenciálódása.

Dr. Adam Balic, Prof. David Hume. The Roslin Institute, Edinburgh, UK; Téma: A CSFR1 (colonia stimuláló faktor 1 receptor) transzgénikus csirketörzs alkalmazása a hemopoietikus sejtek és a bélidegrendszer fejlődésére.

Prof. Mike Gutnick, Prof. Nahum Shpigel, Hebrew University of Jerusalem, Israel; Téma: A humán bélidegrendszer fejlődése, kísérleti állatmodellek fejlesztése.

Dr. Pascal de Santa Barbara, INSERM U1046, Université Montpellier, France; Téma: Bélidegrendszer és a tunica muscularis ontogenezise a gasztrointesztinális rendszerben.

Dr. Donald Newgreen, Murdoch Children's Research Institute, Australia; Téma: Ganglionléc sejtek ontogenezise. Neurointesztinális betegségek *in vitro* modellezése.

Dr. Samantha A. Brugmann, Divisions of Plastic Surgery and Developmental Biology, University of Cincinnati College of Medicine, USA. Téma: *Talpid2* mutáns embryok craniofacialis elváltozásainak és a fejlődő béltraktus radiális mintázatának komparatív embryológiai vizsgálata.

MTMT tudományometriai táblázat
Nagy Nándor tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA VIII. Biológiai Tudományok Osztálya (2020.10.07)

Közlemény típusok ¹	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk	62	---	---	---
teljes cikk ² , nemzetközi folyóiratban	---	56	825	1116
teljes cikk, hazai idegen nyelvű folyóiratban	---	2	11	16
teljes cikk, magyar nyelvű folyóiratban	---	2	1	1
teljes cikk, rövid közlemény	---	2	13	17
II. Könyvek	0	---	---	---
a) Szakkönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
Szakkönyv, kézikönyv, idegen nyelvű	---	0	0	0
Szakkönyv, kézikönyv, magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv szerkesztőként	0	---	---	---
Szakkönyv, kézikönyv, idegen nyelvű	---	0	---	---
Szakkönyv, kézikönyv, magyar nyelvű	---	0	---	---
Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvfejezet	2	---	---	---
Könyvfejezet, idegen nyelvű	---	2	0	0
Könyvfejezet, magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
IV. Konferenciaközlemény	5	---	2	2
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	69	---	852	1152
V. Egyéb tudományos	1	---	---	---
Egyéb tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	0	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	1	1	1
VI. Absztrakt	15	---	0	0
Összesített impakt faktor	194.9	---	---	---
Idézettség száma¹	---	---	853	1153
Hirsch-index¹	21	---	---	---

Speciális tudományometriai adatok	
Első szerzős folyóiratcikkek száma (az összes %-ban) ³	24 (38,71%)
Utolsó szerzős tudományos cikkek száma (az összes %-ban)	7 (11,29%)
Első és utolsó szerzőségű folyóiratcikkek impakt faktorai	98.7
Az utolsó tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2001 -) tudományos folyóiratcikkek összegzett impakt faktora az összes %-ban	97,65%
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	2
Az utolsó 10 év (2010-) tudományos teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	41
Impakt faktor összege	145.5
Folyóiratcikkek, 15-nél több szerzővel	1