

# AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

## Az extracelluláris mikrokörnyezet szerepe a vastagbél idegrendszerének embryonális fejlődésében

Dr. Nagy Nándor



**Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar,  
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet,  
Budapest**

- 2020 -

dc\_1807\_20

## Tartalomjegyzék

PROLÓGUS.....	1
1. BEVEZETÉS .....	2
1.1.    A bélidegrendszer általános felépítése .....	2
1.2.    A bélidegrendszer embryonális eredete .....	6
1.3.    A bélidegrendszer fejlődésének sejtes és molekuláris szabályozása .....	13
1.3.1.    RET jelátvitel szerepe a bélidegrendszer embryonális fejlődésében. ....	14
1.3.2.    EDNRB jelátvitel.....	16
1.3.3.    Transzkripciós faktorok (SOX10, PHOX2B, MASH1, HAND2).....	17
1.3.4.    Epithélium eredetű faktorok (Netrin, Sonic hedgehog). ....	19
1.3.5.    Az extracelluláris mátrix szerepe a bélidegrendszer normál és patológiás fejlődésében .....	21
1.4.    A madár embryo szerepe a bélidegrendszer tanulmányozásában .....	23
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	26
3. MÓDSZEREK.....	27
3.1.    Kísérleti állatok.....	27
3.2.    Sejtvonalak .....	28
3.3.    A minták szövettani feldolgozása .....	28
3.4.    Immuncitokémia .....	29
3.5.    Sejtosztódás kimutatása bromodeoxyuridine (BrdU) és 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) jelöléssel .....	37
3.6. <i>In situ</i> hibridizáció.....	37
3.7.    Western-blot .....	38
3.8.    PCR.....	38
3.9.    Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás .....	39
3.10.    Embryomanipulációs módszerek: .....	39
3.10.1.    Csirke-fürj, fürj-csirke, csirke-egér, csirke-patkány embryonális testüreg kimérák:.....	39
3.10.2.    Chorioallantois membrán transzplantáció: .....	41
3.10.3.    Microgyöngy embryonális transzplantációja. ....	42
3.10.4.    Carbocianin-alapú vitális sejtjelölés .....	42
3.10.5.    Velőcső eltávolítása microsebészeti módszerekkel .....	43
3.10.6.    Csirke embryóban történő funkciónyeréses és funkcióvesztéses mutációk kiváltása replikáció-kompetens RCAS retrovírusokkal. ....	43
3.11.    Sejt-, szerv-, és embryotenyészetek.....	44
3.11.1.    Az enterális idegi őssejtek izolációja, felszaporítása és in vitro differenciáltatása.....	44
3.11.2.    Velőcső és bélcső tenyészet. ....	45

3.11.3.	Kollagén alapú 3D szervtenyészet.....	45
3.11.4.	Függesztett 3D szervtenyészet.....	45
3.11.5.	In vitro migráció tanulmányozása „stripe-choice assay” módszerrel.....	46
4.	EREDMÉNYEK.....	47
4.1.	A velőcső vagus szakaszából származó ganglionléc-eredetű sejtek vándorlása és differenciálódása a csirke embryo vastagbél idegrendszerének fejlődése során.....	47
4.2.	A sacralis velőcsőből származó ganglionléc-eredetű sejtek vándorlása és differenciálódása a vastagbél idegrendszerének fejlődése során.....	55
4.2.1.	A Remak-ganglion részvétele az utóbél bélidegrendszerének fejlődésében.....	58
4.2.3.	A plexus pelvici részvétele az utóbél bélidegrendszerének fejlődésében.....	61
4.3.	Endothelin-3 szerepe a bélidegrendszer fejlődésében.....	65
4.3.1.	Az EDNRB jelátvitel elengedhetetlen az utóbél megfelelő kolonizációjához.....	67
4.3.2.	Embryonális bélkiméra technika, egy új módszer a bélidegrendszer in vivo tanulmányozására.....	68
4.3.3.	Az EDNRB jelátvitel gátlása utóbél hypoganglionózist okozza.....	72
4.3.4.	Az EDN3 serkenti az utóbél területén található ganglionléc-eredetű sejtek osztódását.....	74
4.3.5.	Az EDN3 gátolja az utóbél neuronális differenciálódását.....	74
4.3.6.	Az EDN3 gátolja a ganglionléc-eredetű sejtek GDNF-által indukált vándorlását.....	75
4.4.	Az endothél sejtek szerepe a vastagbél idegrendszer fejlődésében.....	78
4.4.1.	Az endothél sejtek szükségesek az ENCC vándorláshoz.....	80
4.4.2.	Az ENCC-k beta-1-integrin expresszáva vándorolnak az endothél sejteken.....	81
4.4.3.	A laminin kifejezett expressziót mutat a bél kapillárisok körül.....	82
4.4.4.	A zebrahal ENCC-k a bél falban található erek mentén vándorolnak.....	85
4.5.	A viscerális simaizom szerepe a vastagbél idegrendszerének korai fejlődésében.....	86
4.5.1.	Az utóbél simaizom rétegének kialakulása a bélidegrendszertől függetlenül zajlik.....	88
4.5.2.	A simaizom differenciálódásának gátlása rendellenes bélidegrendszerfejlődést okoz.....	88
4.6.	A bél epithelium és a hám-mesenchymális kölcsönhatások szerepe a bélidegrendszer fejlődésében.....	91
4.6.1.	A SHH és a PTC1 expressziója a bélidegrendszer fejlődése során.....	91
4.6.2.	A bél epitheliuma meghatározó szerepet játszik a bélidegrendszer fejlődésében.....	92
4.6.3.	A SHH jelátvitel gátlása intesztinális hyperganglionozishoz vezet.....	95
4.6.4.	A SHH elősegíti az enterális neuronok differenciálódását.....	96
4.6.5.	A SHH az extracelluláris mátrix expressziós mintázatát szabályozza a fejlődő bélben.....	99
4.6.6.	A SHH retrovírus mediált funkciónyerés aganglionózist okoz.....	102
4.6.7.	A SHH mesenchymális kollagén IX expressziót indukál.....	104
4.6.8.	A SHH közvetett módon gátolja az ENCC-k migrációját.....	105

4.6.9.	A SHH gátolja az egér bélidegrendszer fejlődését.....	107
4.7.	Tenascin-C szerepe a bélidegrendszer fejlődésében .....	108
4.7.1.	A vagus velőcső régióból származó ganglionléc-eredetű sejtek tenascin-C-t fejeznek ki. .....	110
4.7.2.	ENCC sejtek meghatározzák a tenascin-C expressziós mintázatát.....	110
4.7.3.	Az ENCC sejtek tenascin-C-t termelnek a bélidegrendszer fejlődése alatt. ....	112
4.7.4.	A tenascin-C elősegíti az ENCC sejtek migrálását. ....	117
4.9.	Agrin és kollagén XVIII szerepe a bélidegrendszer fejlődésében. ....	118
4.9.1.	ECM molekulák expressziós mintázata a fejlődő bélben. ....	118
4.9.2.	ENCC-k jelenléte szükséges a bélidegrendszerhez-asszociált kollagén XVIII és agrin expresszióhoz. ....	123
4.9.3.	ENCC-k kollagén XVIII és agrin típusú HSPG-t termelnek. ....	125
4.9.4.	Az agrin és a kollagén XVIII hatása az enterális ganglionléc-eredetű sejtek vándorlására. ....	128
5.	EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KONKLÚZIÓ .....	131
5.1.	A vastagbél idegrendszerének embryonális fejlődése a madár embryóban. ....	132
5.2.	Plexus pelvicultól származó ganglionléc-eredetű sejtek részt vesznek a vastagbél idegrendszerének fejlődésében. ....	135
5.3.	EDN3 serkenti a ganglionléc sejtek proliferációját, gátolja a GDNF indukált differenciálódást, és biztosítja a ganglionléc sejtek vastagbélbe történő bevándorlását. ....	138
5.4.	A ganglionléc eredetű sejtek vándorlása, differenciálódása az endothél sejtek felszínén történik. ....	142
5.5.	Az utóbél bélidegrendszerének mintázatához megfelelő simaizomfejlődés szükséges. ...	145
5.6.	Hám-mesenchymális kölcsönhatások határozzák meg a bélidegrendszer radiális szimmetriát mutató fejlődését.....	147
5.7.	Az ENCC-k extracelluláris mátrixot (tenascin-C, agrin és kollagén XVIII) termelnek, hogy átalakítsák mikrokörnyezetüket és szabályozzák migrációjukat az ENS fejlődése során..	151
5.8.	Címlapfotók .....	157
5.9.	További kutatások, tervek .....	158
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....		164
IRODALOMJEGYZÉK .....		165

dc\_1807\_20

## PROLÓGUS

*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 sejt típus 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.*

## 1. BEVEZETÉS

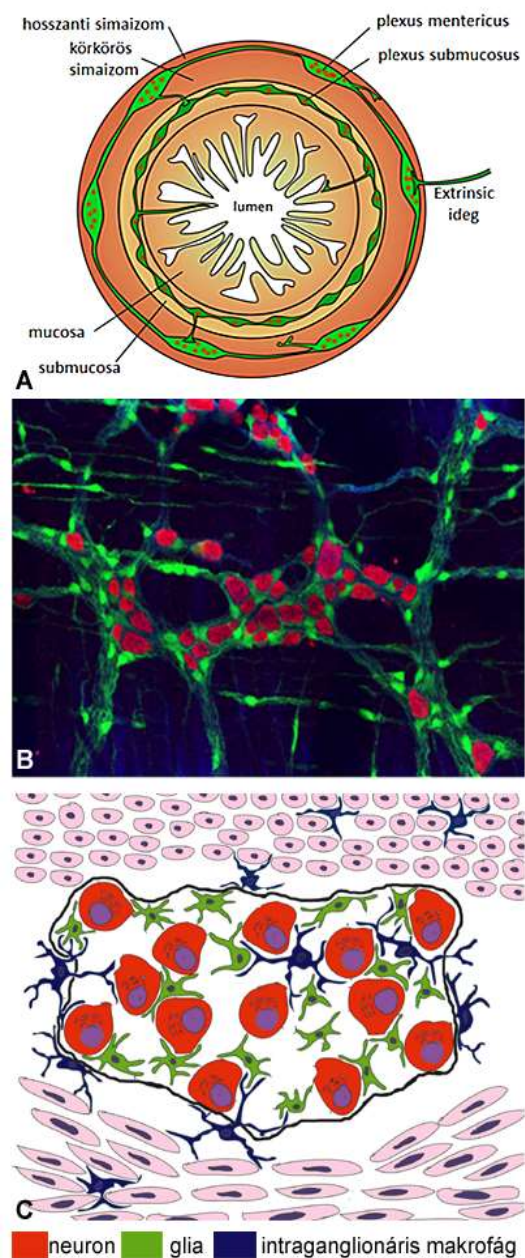
### 1.1. A bélidegrendszer általános felépítése

A gasztrointesztinális traktus számos olyan komplex funkcióért felelős szervrendszer, amely nélkülözhetetlen a szervezet túlélése szempontjából. Ide tartozik (1) a táplálék és a salakanyag transzportja, (2) a tápanyagok emésztése és felszívása, (3) a víz, elektrolitok, nyák, szignál molekulák és antimikrobiális anyagok kiválasztása, (4) a bélrendszer barrier funkciójának a megőrzése, (5) az egészséges bélflóra fenntartása, (6) valamint a szervezetbe bekerült patogének, allergének és toxinok elleni védelem (Goldstein és mtsai., 2013; Schneider és mtsai., 2019). Ezeknek a kritikus folyamatoknak a szabályozása elsősorban a bélidegrendszerre, a gasztrointesztinális traktus saját intrinsic idegrendszerére támaszkodik. A bélidegrendszer az autonóm idegrendszer legnagyobb alegysége. Míg a béltraktus extrinsic beidegzését a bélidegrendszer aktivitását is befolyásolni képes szimpatikus és paraszimpatikus idegrendszer szolgáltatja, addig a bélidegrendszer képes a központi idegrendszer irányításától teljesen független, autonóm módon is működni, amiért rendszeresen "második agynak" szokták nevezni (Gershon, 1999a).

A bélidegrendszer két koncentrikusan elhelyezkedő idegi plexusból áll, amiket az enterális neuronokból és gliasejtekből álló ganglionok építenek fel. A plexus myentericus (*Auerbach-féle plexus*) a bélfal körkörös és a hosszanti simaizomrétege között helyezkedik el és a bélhuzam teljes hosszában megtalálható. A plexus submucosus, amely az esophagus területén hiányzik, egy külső (*Schabadasch-féle plexus*) és egy belső (*Meissner-féle plexus*) hálózatából tevődik össze (Timmermans és mtsai., 2001). Mivel nagyon kiterjedt kapcsolat van a két submucosalis ganglionrendszer között és funkcionális különbséget sem azonosítottak, ezért rendszerint egyként emlegetik őket. A bélidegrendszer több mint 100 millió sejtből és legalább 18 funkcionális altípusba sorolható neuronból áll (Furness és Costa, 1980; Brookes, 2001). Fontos megjegyezni, hogy a központi idegrendszerben azonosított neurotranszmitterek a bélidegrendszer neuronjaiban is előfordulnak. A bélidegrendszert négy fő típusba sorolható neuron alkotja: motoneuronok, intesztinofugális neuronok, intrinsic primer afferens neuronok (intrinsic primary afferent neuron; IPAN), és interneuronok (Furness, 2000). Az IPAN-ok szenzoros neuronok, amelyek a bél lumenéből származó mechanikus és kémiai stimulusokat észlelik, majd a serkentő és gátló interneuronokon



keresztül jeleket küldenek az effektor sejtekhez, beleértve az epitheliális és simaizom sejteket is. Az intrinsic neuronális kör polarizált, ezzel érhető el, hogy a béltartalom mozgása egyenirányított legyen. A bél lumenének feszülése felszálló pályákat aktivál, amelynek következtében a stimulus feletti bélszakasz simaizma kontrakcióba kerül, míg ezzel egyidejűleg a leszálló pályák aktivációja következtében a stimulus alatti szakasz simaizma relaxációba kerül. Ezeknek a mechanizmusoknak köszönhetően a lumen tartalma aborális irányú mozgást végez. Ezt az alapvető folyamatot Bayliss és Starling a “bélrendszer törvényeként” írta le 1899-ben (Bayliss és Starling, 1899).



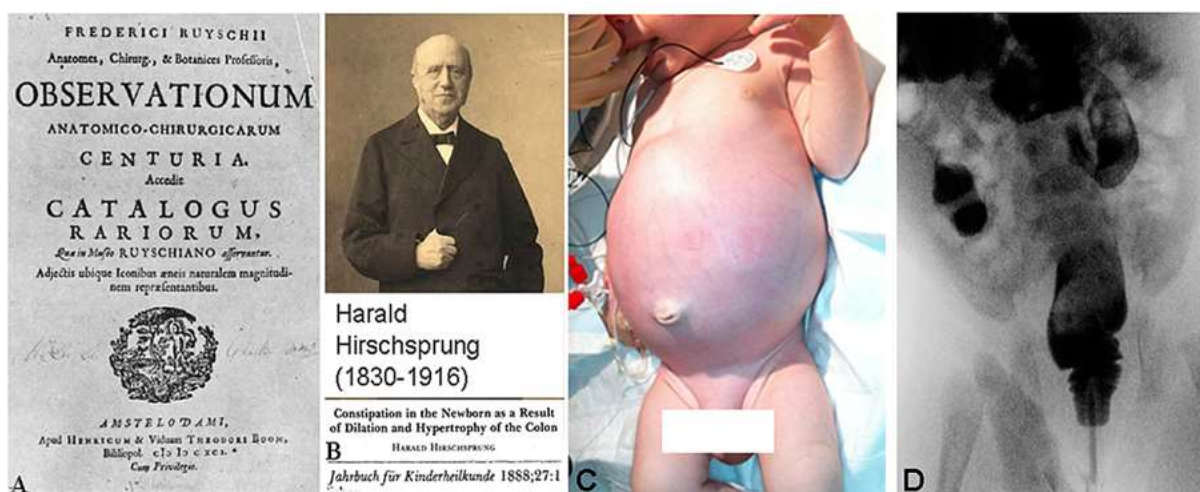
Madárban és emlősben végzett legutóbbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a bélidegrendszer ganglionjaiban nyúlványos myeloid sejtek fordulnak elő (Dóra és mtsai., 2018). Ezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét, hogy az enterális ganglionokban a neuronokon és gliasejteken kívül egy harmadik sejtpopuláció is létezik. Az “intraganglionáris makrofágok” az enterális neuronokat és gliát körbefonva, a ganglionokat környezetüktől elhatároló kötőszövetes kapszulán (Nagy és mtsai., 2018) belül helyezkednek el, és mikroglia specifikus sejtfelszíni markereket expresszálnak (De Schepper és mtsai., 2019; Dóra és mtsai., 2018).

**1 ábra: Bélidegrendszer a vastagbélben. A.)** A neuronok két plexus mentén ganglionokba rendeződnek (zöld). A külső plexus myentericus a bélfal hosszanti és a körkörös simaizomrétege között helyezkedik el, míg a belső plexus submucosus a körkörös simaizomréteg luminális oldalán található (módosítva Heanue és Pachnis, 2007 után). **B.)** Felnőtt egér vastagbélben végzett teljes-szöveti hármass fluoreszcens jelölés a glia (PLP1-GFP proteint expresszál, zöld szín) és a neuron (HU+, piros szín) sejtekből álló plexus myentericus ganglionjait mutatja (Nagy és Goldstein, 2017). **C.)** Intraganglionáris makrofágok viszonya a ganglion neuron és glia elemeivel (módosítva Dóra és mtsai., 2018 után).

Az érző, motoros és interneuronok közreműködésével létrejött lokális reflexívek szabályozzák a bél valamennyi funkcióját; mint a motilitás, víz- és ionszekréció, vérellátás és immunválasz (Kirchgeßner és Gershon, 1990). Ezek alapján a bélidegrendszer esszenciális szerepe megkérdőjelezhetetlen és nem meglepő, hogy a szerzett vagy veleszületett rendellenességek súlyos egészségügyi következményekkel járnak. Példaként említhető a gyulladós enterális neuropátia, melyet paraneoplázia, fertőzés vagy immunmediált megbetegedés idéz elő. Ezek a kórképek gastroparesishez, bélrendszeri pseudo-obstrukcióhoz és colon renyhességéhez vezethetnek. A nyelőcsőachaláziában és a veleszületett hipertrófikus pylorus stenosisban is leírták a szelektív neurotranszmitterek meghibásodását. Mindkét megbetegedés rendellenes sphincter funkcióval jár. A mitochondriális neurogastrointestinális encephalopathiában kialakuló mitochondrium diszfunkció a neuronok meghibásodásához vezet és következményesen intestinális motilitási zavart eredményez. A 2B típusú endokrin neopláziában előforduló enterális ganglioneuroma számos esetben colon rendellenes motilitással jár együtt (Goldstein és mtsai., 2013). A veleszületett fejlődési rendellenességek jellemző megjelenési formája a gasztrointesztinális rendszer motoros diszfunkciója, mint a gastroparézis, a bél pseudo-obstrukciója és a vastagbél motilitási zavara (Goldstein és mtsai., 2016). Az ellátással kapcsolatos egyre növekvő igények kielégítéséhez elengedhetetlen a terápiás lehetőségek folyamatos fejlesztése, amelynek hátterét az embryonális fejlődés pontosabb feltárása biztosíthatja.

A bélidegrendszert érintő fejlődési rendellenességek közül az egyik legjobban ismert és karakterizált betegség a Hirschsprung-kór (*megacolon congenitum*). Ez a veleszületett, elsősorban a vastagbél idegrendszerét érintő elváltozás, emberben 1:5000 arányban fordul elő. A betegségre jellemző, hogy a bélidegrendszert embryonálisan létrehozó ganglionléc-eredetű sejtek migrációjának zavara miatt, a belső analis sphincter izom felett ganglionmentes szakasz alakul ki. Ez a bélszakasz nem képes relaxációra és állandó tónusos kontrakcióban van; a szűkület feletti vastagbélszakasz pedig következményesen kitágul. A Hirschsprung-kórt jellemző megacolonról először Frederik Ruysch holland anatómus számolt be 1691-ben (Leenders és Sieber, 1970), 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 8%-ban érinti. A legtöbb beteg esetében sporadikus megjelenésről beszélhetünk, de előfordulnak nem-Mendeli, multifaktoriális öröklődéssel

jellemezhető esetek is. A nemek közötti arány 4:1 férfi túlsúlyt mutat. 70%-ban izolált formában jelenik meg, ugyanakkor előfordul egyéb születési rendellenesség részeként is. Gyakran kapcsolódik a 21-es triszómiához (Down-szindróma, ahol 25%-al gyakoribb a Hirschsprung fenotípus előfordulása) és a IV-es típusú Waardenburg szindrómához is (Schill és mtsai., 2019). Ugyancsak bélidegrendszer fejlődési zavar áll a hypoganglionozis vagy a hyperganglionozissal és ectopicus ganglionok megjelenésével együtt járó neurondysplasiák esetében is.



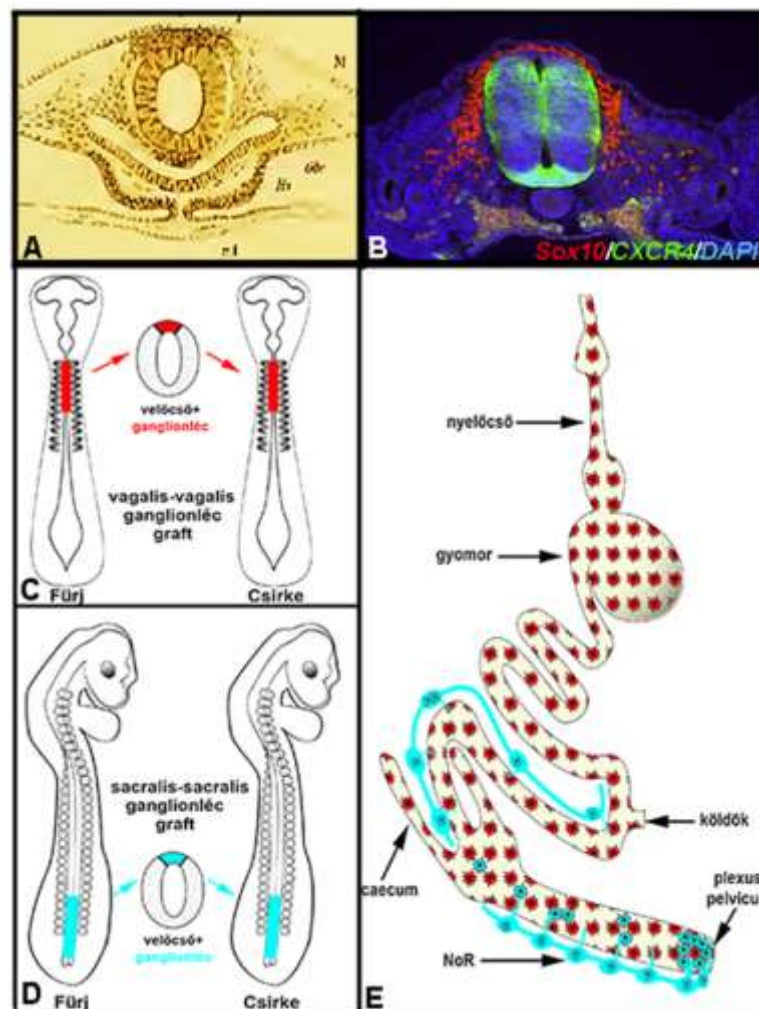
**2. ábra: A Hirschsprung-kór felfedezésének történeti áttekintése. A.)** Frederik Ruysch 1691-ben megjelent sebészeti anatómia könyvének címlapja, amelyben elsőként említi a megacolont. **B.)** Harald Hirschsprung portréja és a congenitális megacolont részletesen leíró publikáció fejléce. **C.)** Orvar Swenson 1949-ben ismerte fel először, hogy a Hirschsprung-kór elsődleges hibáját a distális colorectum idegrendszerének hiánya jelenti. A bélperisztaltika az érintett szegmens területén hiányzik, a béltartalom pang (**D. kép**), a proximális, normál beidegzéssel rendelkező szakasz jelentősen kitágul és a has felpuffad. (C, D. képek Dr. Allan M. Goldstein jóvoltából).

Habár az elmúlt évtized Hirschsprung-kórt célzó genetikai vizsgálataiból számos gén mutációját is azonosították (*GDNF*, *Endothelin-3*, *BMP4*, *netrin*, *retinsav*, *beta-1 integrin*, *Hedgehog fehérjék*, *HAND2*, *HOXB5*, *SOX10*), mégis a bélidegrendszer normális és kóros fejlődésében szerepet játszó komplex fejlődésbiológiai mechanizmusokról csak kevés ismerettel rendelkezünk. (Burns és mtsai., 2016; Nagy és Goldstein, 2017; Rao és Gershon, 2018).

## 1.2. A bélidegrendszer embryonális eredete

Az embryonális fejlődés során egy multipotens és intenzív migrációs képességgel rendelkező mesenchymális sejttípus, az úgy nevezett ganglionléc sejt (dúcléc, crista neuralis, neural crest cell=NCC), epithelio-mesenchymális átalakulással leválik a záródó cranialis velőredőkről és a velőcső törzsi szakaszának már záródott neuroepitheliális redőiről (Bronner és LeDouarin, 2012). Ezek az újonnan formálódott multipotens őssejtek a velőcső meghatározott szintjéről származnak (cranialis, cardialis, vagus, törzsi és sacralis régió), az embryon keresztül intenzív migrációt folytatnak, különböző szervkezdeményeket kolonizálnak ahol eltérő sejttípusokká (kötőszövet, endokrin sejtek, melanociták, perifériás idegrendszer alkotó glia és neuron sejtek) differenciálódnak (Bronner és LeDouarin, 2012; Hutson és Kirby, 2007; Le Douarin, 2004; Le Douarin és Teillet, 1973b; Yntema és Hammond, 1954). Habár a ganglionléc sejtek fejlődését számos embryonális modellrendszerben tanulmányozták, a kísérleti embryológiai vizsgálatokra a madár embryo bizonyult a legalkalmasabb kísérletes modellnek (Goldstein és Nagy, 2008). A ganglionléc-eredetű sejteket elsőként a madár embryóban Wilhem His svájci anatómus (1868) írta le (Bronner és Simões-Costa, 2016). Közel száz évvel később, Yntema és Hammond (1954) egy klasszikus tanulmányt publikáltak, amelyben bemutatták, hogy amennyiben csirke embryóból eltávolítják a dorsalis velőcső területét együtt a ganglionléccel az a bélidegrendszer teljes hiányát eredményezte, s ezzel először bizonyították kísérletesen a bélidegrendszer ganglionléc eredetét (Yntema és Hammond, 1954). Az eredményeket tovább finomították a különböző fajok közötti transzplantációs kiméra kísérletek. Csirke-fürj embryokon végzett velőcső transzplantációs kísérletekkel mutatták ki, hogy a bélidegrendszer jelentős része a velőcső vagus régiójából, az oticus placod mögött, az utóagy szintjén elhelyezkedő 1-7. szomitapárral szomszédos ganglionléc sejtekből származik (Burns és Le Douarin, 1998; Burns és Le Douarin, 2001; Le Douarin és Teillet, 1973b; Nagy és mtsai., 2012a). A madárembryokon végzett részletes sorstérképezési kísérletek hozzájárultak ahhoz, hogy a különböző velőcsőrégiókból származó ganglionléc-eredetű sejtek változatos differenciálódási képességét megértsük (Barlow és mtsai., 2008; Burns és mtsai., 2000; Durbec és mtsai., 1996; Espinosa-Medina és mtsai., 2017; Kuo és Erickson, 2010). A csirke embryo 1-2. szomitájának magasságában lévő velőcső szakasz azonos korú fürj embryóból származó velőcsőszakasszal történő kicserélése azt eredményezi, hogy a fürj eredetű ganglionléc sejtek

csak a nyelőcső területén jelennek meg. Ugyanezt a kísérletet a 3-5. szomiták magasságában elvégezve azt látjuk, hogy a fürj eredetű sejtek a gyomortól az utóbélig járulnak hozzá a bélidegrendszer kialakulásához, míg a 6-7. magasságából származó sejtek kizárólag az utóbél idegrendszerének létrehozására korlátozódnak (Burns és mtsai., 2000). Érdekes megfigyelés, hogy a 3. szomita szintjén származó ganglionléc sejtek különösen fontos szerepet töltenek be a bélidegrendszer formálódásában, ugyanis ez a szakasz képes kompenzálni a vagus régióban található teljes velőcső szakasz eltávolítását (Barlow és mtsai., 2008). Később, zebrahal, egér és patkány embryóban végzett kísérletekben is igazolták, hogy a teljes bélidegrendszer a velőcső eredetű ganglionléc sejtekből származik.



**3. ábra: A bélidegrendszer a velőcső dorsalis területéről kivándorló ganglionléc sejtekből származik. A.)** Wilhelm His eredeti munkájából származó sémás rajz a velőcső nyaki szakaszából kivándorló ganglionléc sejtekről. **B.)** Korai csirke embryo keresztmetszetén megfigyelhetők a velőcsőből kiáramló SOX10 transzkripciós faktort expresszáló ganglionléc sejtek (*saját felvétel*). **C-E.)** Csirke-fürj kiméra módszerekkel (vagus és sacralis régióból átültetett velőcső) bizonyították először kísérletesen, hogy a velőcső eredetű ganglionléc sejtek kolonizálják az embryonális bélcső különböző szakaszait és belőlük fejlődik ki a teljes bélidegrendszer (*Goldstein és Nagy, 2008*).



A sejtek delaminációját követően, a vagus régióból származó ganglionléc-eredetű sejtek két külön útvonal mentén vándorolnak. Először a 10 szomitás stádiumban (csirkében a 10 Hamburger-Hamilton (HH) stádium, ami 2 embryonális napnak felel meg; egérben a 8,5 embryonális napon, E8.5) az 1-3. szomiták magasságából származó ganglionléc-eredetű sejtek az ektoderma alatt laterális irányba vándorolnak, hogy a garatíveket és a szív truncus aortico-pulmonaris szakaszát kolonizálják. Néhány órával később, a 13-as HH stádiumtól kezdve, ugyancsak az 1-3. szomiták magasságából, egy második populáció indul ventrális irányba a velőcső és a szomiták között haladva, amelyekből néhány sejt a szimpatikus és a hátsó érző dúcba, a többi pedig a proximális előbélbe lép be és részt vesz a bélidegrendszer létrehozásában (Kuo és Erickson, 2010). *In situ* hybridizációval kimutatták, hogy az 1-3. szomiták szintjén kiinduló ganglionléc sejtek CXCR4 receptort nem expresszáló csoportja az előbél idegrendszerét hozza létre, míg a CXCR4-et kifejező sejtek a pharingeális mesoderma és a fejlődő szív conotrunkális mesenchymájában termelt SDF1 nevezetű növekedési faktor irányába koncentrációgradiens mentén vándorolva kolonizálják a szív telepét (Escot és mtsai., 2013). Ezzel szemben, a 4-7. szomiták magasságából származó ganglionléc sejtek csak ventrális irányba vándorolnak és az előbélben található migrációs folyamathoz csatlakoznak. A vagus régiótól caudálisan elhelyezkedő törzsi ganglionléc-eredetű sejtek nem lépnek be az előbélbe. Ez a folyamat feltehetőleg a SLIT-ROBO interakcióknak köszönhető. Az előbél SLIT2 molekulát expresszál, amely chemorepellens hatással van a ROBO receptort expresszáló törzsi ganglionléc-eredetű sejtekre, míg a ROBO-negatív vagus régióból kilépő ganglionléc-ből származó sejteken nem érvényesül ez a hatás (De Bellard és mtsai., 2003; Zuhdi és mtsai., 2015). A ganglionléc eredetű sejtek előbélbe történő belépése az embryogenezis során viszonylag korán bekövetkezik: a fertilizációt követően 32 órával zebrahal embryóban (Shepherd és mtsai., 2004), csirkében és fürjben a 2. embryonális napon (Burns és Le Douarin, 1998), egérben az E9.5 korban (Anderson és mtsai., 2006a), és humán embryóban a terhesség 4. hetében (Fu és mtsai., 2003) figyelhető meg (1. táblázat).

Néhány közelmúltban megjelent tanulmány azt feltételezi, hogy a ganglionléc eredetű sejtek bélidegrendszer irányú elkötelezettsége a szomiták környezetének köszönhető, amelyben a paraxiális mesoderma által lokálisan termelt retinsav az  $\alpha$  és a  $\gamma$  retinsav receptorokat (RAR $\alpha$ , RAR $\alpha$ 2, RAR $\gamma$ ) expresszáló (Cui és mtsai., 2003; Simkin és mtsai., 2013) vándorló ganglionléc sejtekre hat. Ez a kapcsolat aktiválja a bélidegrendszer fejlődése

szempontjából kritikusan fontos fehérije, a c-RET tirozin kináz receptor (Simkin és mtsai., 2013) ganglionléc sejteken történő expresszióját. Egérben a retinsav termelés szempontjából elengedhetetlen retinaldehid dehidrogenáz (RALDH2) hibájának következtében bélidegrendszer agenesia alakul ki, melynek oka a vagus régióból származó ganglionléc eredetű sejtek *RET* receptorának alulszabályozásában rejlik (Niederreither, 2003).

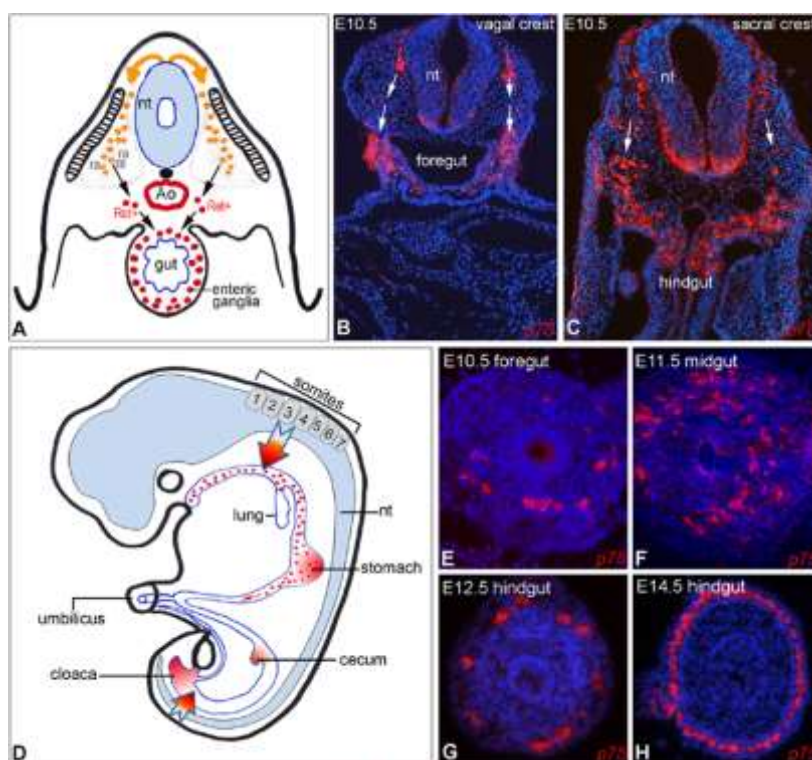
**1. táblázat: A gerinces bélidegrendszer embryonális fejlődésének összehasonlítása:** a béltraktust különböző szakaszait kolonizáló ganglionléc-eredetű sejtek megjelenésének időpontja (Nagy és Goldstein, 2017). hpf, fertilizációt követő órák száma; E, embryonális nap.

	Proximális előbél	Gyomor	Coecum	Distalis utóbél
<b>Zebrahal</b>	32 hpf	-	-	66 hpf
<b>Fürj</b>	E2.5	E4	E5	E7
<b>Csirke</b>	E2.5	E4.5	E5.5	E8
<b>Egér</b>	E9.5	E10.5	E11.5	E14.5
<b>Humán</b>	3. hét	4. hét	6. hét	7. hét

Attól a pillanattól kezdve, amikor a ganglionléc eredetű sejtek belépnek az előbél mesenchymájába már enterális ganglionléc eredetű sejteknek (ENCC) nevezzük őket. A *RET*-et expresszáló ENCC sejtek cranio-caudális irányba vándorolnak és a bélcső teljes hosszát kolonizálják. A sejt migráció csirke és egér embryokban megközelítőleg 40  $\mu\text{m}/\text{óra}$  sebességgel történik (Allan és Newgreen, 1980; Young és mtsai., 2004). Immunocitokémiai elemzések részletesen meghatározták a ENCC-k migrációs mintázatát (Allan és Newgreen, 1980; Betters és mtsai., 2010; Fu és mtsai., 2003; Fu és mtsai., 2004a; Nagy és mtsai., 2012a; Shepherd és Eisen, 2011; Wallace és Burns, 2005; Young és mtsai., 1998; Young és mtsai., 1999). Zebrahal embryóban az ENCC-k a fertilizációt követő 66 óra elteltével a bél mesenchyma két oldalán párhuzamos láncokban kolonizálják a fejlődő belet, majd a bélcső körüli körkörös migráció során befejezik a kolonizációt (Shepherd és Eisen, 2011). Madarakban és rágcsálókban a vándorló ENCC-k véletlenszerűen oszlanak el az előbél és a középbél külső mesenchymális rétegében, ahol ebben a stádiumban a simaizom differenciálódása még nem indult meg (Allan és Newgreen, 1980; Burns és Le Douarin, 1998; Kapur és mtsai., 1992; Wallace és Burns, 2005; Young és Newgreen, 2001b). Miközben a legelő haladó sejtek (wavefront cells) a coecum felé haladnak a körkörös simaizom elkezd differenciálódni, így az ENCC-k a bélfal

legkülső rétegére, a simaizom és a serosa közé korlátozódnak, ahol később a plexus myentericus jön létre. A középbélben a myentericus ENCC-k egyik csoportja radiális irányba haladva

az epithélium felé vándorol, átmegegy a simaizom sejtek rétegein, hogy a submucosalis mesenchymát kolonizálva plexus submucosust hozzon létre (Uesaka és mtsai., 2013). Az összes tanulmányozott fajban a plexus myentericus előbb fejlődik ki, mint a plexus submucosus, egyetlen kivétel a madár colorectuma, ahol a plexus submucosus fejlődik előbb (Nagy és Goldstein, 2006b; Nagy és mtsai., 2012a). Ellentétben a cranialis helyzetű bélszakaszoktól, a colorectumot létrehozó utóbél ENCC kolonizációja és a simaizomréteg differenciálódása eltérő sorrendet mutat. Korábban többször is megfigyeltük, hogy a simaizom hamarabb differenciálódik, mint a proximális utóbél ENCC kolonizációja, de a simaizom bélidegrendszer fejlődésére gyakorolt hatásmechanizmusa nem ismert.



**4. ábra: A bélidegrendszert létrehozó ganglionléc-eredetű őssejtek migrációja, eloszlási mintázata és differenciálódása az egér embryóban. A.)** A ganglionléc-ből származó sejtek kivándorolnak a velőcsőből és áthaladnak a szomitákon, ahol retinsav hatására c-RET receptort expresszálnak, mielőtt belépnének az előbél mesenchymájába. **B.)** Az E10.5 egér embryo vagus és **(C)** lumbo-sacralis szakaszán p75 + ganglionléc sejtek (piros) velőcsőből a bélbe vándorolnak (fehér nyilak mutatják a migrációs útvonalat). **D.)** Vázlatos ábra a vagus és sacralis ganglionléc-eredetű sejtek (nyilak) hozzájárulást mutatja a fejlődő bélidegrendszerhez. A vörös pontok a vándorló ENCC-eket jelölik. A gyomorban, coecumban és a cloacában piros színel árnyékolt területek az Endothelin-3 és a GDNF növekedési faktorok magas koncentrációját jelentik. **E-H.)** E10.5 stádiumban a ganglionléc sejtek



belépnek az előbél mesenchymájába, 1 nappal később elérik a középbelet, 14 napos embryonális korra a distalis colorectumot is kolonizálják (Nagy és Goldstein, 2017).

A madár és a humán embryóban a bélidegrendszer fejlődési mintázata nagyon hasonló, mindkét neurális plexus kialakul a fejlődés korai szakaszában, míg ezzel szemben az egér és patkány embryók colorectumában található plexus submucosus csak a születést követően jelenik meg (Burns és Le Douarin, 2001; McKeown és mtsai., 2001; Nagy és mtsai., 2012a; Wallace és Burns, 2005). A halaknak nincs plexus submucosusa, míg a kétélűek és a hüllők csak a nyelőcső és a gyomor területén elhelyezkedő egyszerűbb plexus submucosus-szal rendelkeznek (Gunn, 1951; Lamanna és mtsai., 1999; Wallace és mtsai., 2005).

Annak ellenére, hogy a bélidegrendszer legnagyobb részét a vagus régióból származó ganglionléc sejtek hozzák létre, a velőcsőnek egy caudalisabb régiója, a sacralis ganglionléc is részt vesz az enterális plexusok kialakításában. Csirke embryókban végzett ganglionléc ablációs és csirke-fürj velőcső transzplantációs kísérlete (Burns és mtsai., 1998; Kapur, 2000a; Le Douarin és Teillet, 1973b; Nagy és mtsai., 2012b; Serbedzija és mtsai., 1991; Yntema és Hammond, 1955), valamint az organotipikus tenyészetek és a transzgenikus egerek videomikroszkópiás elemzése kimutatta, hogy a 28-as szomitától caudalisan elhelyezkedő ganglionléc szakasz szintén hozzájárul a distalis colorectum bélidegrendszerének kialakulásához (3. ábra). Hasonlóan a vagus régióból származó ganglionléchez, a sacralis eredetű ganglionléc sejtek is a szomiták és a farokbimbó mesenchymáján keresztül ventrális irányba haladva a cloaca és a distalis utóbél oldalán halmozódnak fel, ahol a gazdagon ganglionált plexus pelvicust hozzák létre. Csirke embryóban a sacralis ganglionléc eredetű sejtek az embryonális fejlődés 3. napján vándorolnak ki a velőcsőből és 48 órával később kolonizálják a cloaca régióját, egérembyóban ez a folyamat a 9.5-11.5 embryonális nap között történik (Nagy és mtsai., 2007b; Wang és mtsai., 2011). Madarakban a Remak-féle vegetatív ganglion (Remak-ganglion) szintén a sacralis ganglionléc származéka; az utóbél dorsális területén helyezkedik el, a cloaca-tól veszi kezdetét és felnyúlik egészen a középbél felső harmadáig és a bél extrinsic autonóm beidegzéséhez járul hozzá. Érdekes módon a sacralis ganglionléc eredetű sejtek csak azután lépnek be az utóbélbe, miután a vagus régióból származó enterális ganglionléc sejtek megérkeztek (Burns és Le Douarin, 1998). Habár a csirke-fürj sacralis velőcső kimérás kísérletek (Burns és Le Douarin, 1998) felfedték, hogy a sacralis eredetű enterális ganglionléc sejtek egy posterior-anterior irányú gradiensnek megfelelően hozzájárulnak az utóbél idegrendszeréhez (distalis szakaszon, közel a cloacához

az enterális neuronoknak több, mint 17%-a sacralis eredetű, míg ez a szám a proximális utóbél szakaszon csak 0.3%). Továbbra is kérdés, **hogyan az utóbél bélidegrendszerének képzése során a sacralis ganglionlécből származó sejtek előbb a plexus pelvicust és a Remak-féle ideget hozzák létre és csak azután népesítik be a distalis vastagbelet, vagy ez két egymástól független esemény?** (Kapur, 2000b; Nagy és mtsai., 2007a; Wang és mtsai., 2011). Zebrahal és humán embryóban egyelőre nem rendelkezünk sacralis ganglionlécre vonatkozó információval (Shepherd és Eisen, 2011).

A vagus régióból származó ganglionléc sejtek sajátossága, hogy sokkal invazívabb migrációs képességet mutatnak, mint a sacralis eredetű sejtek. Amikor a sacralis velőcsövet vagus velőcsővel helyettesítik, a transzplantált ganglionléc sejtek a normál útvonalon keresztül kolonizálják a distalis utóbelet, de mindezt a fejlődés egy sokkal korábbi szakaszában és sokkal nagyobb számban teszik meg (Burns és mtsai., 2002). Összehasonlító microarray analízissel kísérelték meghatározni a különbségeket a vagus és a sacralis régió ganglionléc sejtjei között. A vizsgálat során a *RET* transzkripció négyszer magasabb expresszióját figyelték meg a vagus régióból származó ganglionléc sejtekben, ami magyarázhatja a fokozottabb migrációs invazivitást. Ezt a hipotézist erősíti, hogy a *RET* kísérletesen fokozott expressziója megnöveli a sacralis ganglionléc-eredetű sejtek kolonizációs potenciálját, molekuláris bizonyítékot adva a különböző eredetű ganglionléc sejtek bélidegrendszer kialakulásában betöltött mértékének intrinsic különbségeire (Delalande és mtsai., 2008).

Azon kívül, hogy a vagus és a sacralis régiókból származó ENCC-k kolonizálják a belet, transzgenikus egérembrion végzett genetikai követéses kísérletek felvetették annak a lehetőségét, hogy létezik egy ganglionléc eredetű sejtpopuláció, amely nem követi a hagyományos cranio-caudalis vagy caudo-cranialis migrációs útvonalakat. A kísérletek szerint a Schwann sejt prekursorok egy alcsoportja külső idegrostokon keresztül vándorolva népesítik be az utóbelet és a colorectumban található bélidegrendszer közel 20%-nak a kialakulásához járulnak hozzá (Uesaka és mtsai., 2015). Ugyanez a kutatócsoport egy másik tanulmányában megmutatta, hogy az ENCC-ek egy alcsoportja az egér középbelébe vándorolva elkerülik a coecumot, distalis középbeléből a mesenteriumon áthaladva érik el az utóbelet, amely ebben a fejlődési stádiumban még átmenetileg a középbel szoros közelségében helyezkedik el. Úgy tűnik, hogy a transzmesenterális migráció is hozzá-

járul az utóbél distalis kétharmadában található bélidegrendszer kialakulásához (Nishiyama és mtsai., 2012).

### **1.3. A bélidegrendszer fejlődésének sejtes és molekuláris szabályozása**

A ganglionléc eredetű sejtek intenzív vándorlásokon mennek keresztül, amely a velőcső vagus és sacralis szintjének magasságában kezdődik és a distalis utóbélben ér véget. A migráció idején a sejt túlélésének, osztódásának és differenciálódásának is szigorúan szabályozottnak kell lennie, mivel ez biztosítja, hogy a teljes gasztrointesztinális traktus beidegzéséhez megfelelő denzitású és diverzitású enterális neurális plexus alakuljon ki. A ganglionléc sejtek intenzív sejtproliferációja szükséges azért, hogy a teljes bélcsatorna benépesítéséhez elegendő prekursor jöjjön létre, ugyanakkor a túlélés és az irányított vándorlás elengedhetetlen a sejtek koncentrikus mintázatba való rendeződéséhez. Továbbá, a neuron és glia sejtekké történő differenciálódás, a ganglionok kialakulása, az axon térbeli kiterjesztése és a szinapszisképzés szükséges a fejlett neurális hálózat kialakításához. Ezeket a komplex folyamatokat számos transzkripció faktor, sejt felszíni receptor és neurotrofikus szignál szabályozza.

A sejtproliferáció a fő hajtóerő, amely rendkívül fontos a bélidegrendszer fejlődése szempontjából, mivel fenntartja a sejtsűrűséget és ezen keresztül a migrációs sebességet (Landman és mtsai., 2007; Simpson és mtsai., 2007). Az ENCC-k legelől haladó csoportjában megfelelő sejtsűrűség elérése szükséges ahhoz, hogy kialakulhasson egy olyan csoport, amivel migráció fentartható (Barlow és mtsai., 2008; Young és mtsai., 2004). Csirke embryóban a vagus régióból származó ganglionléc-eredetű sejt populáció számának kísérletes csökkentése változó hosszúságú distalis aganglionózist eredményez (Barlow és mtsai., 2008; Burns és mtsai., 2000; Peters-van der Sanden és mtsai., 1993). Videomikroszkópiás és immunjelöléses kísérletekből nyert bizonyítékok arra utalnak, hogy a legelől haladó ENCC-k magas migrációs aktivitása az ún. "lánc migrációra" támaszkodik. Ez egy olyan folyamat, amelyben a sejt migráció akkor erősödik, amikor az ENCC-k egymással érintkeznek (Druckenbrod és Epstein, 2005a; Druckenbrod és Epstein, 2007; Young és mtsai., 2004). Izolált ENCC-k nem vándorolnak olyan gyorsan vagy olyan irányítottan, mint a láncolatban lévő sejtek csoportja (Young és mtsai., 2014), ez kihangsúlyozza, hogy a bélidegrendszer fejlődése során milyen fontos a sejt-sejt kapcsolat. A hipotézis kísérletes alátámasztása az L1 sejtadhéziós molekula

(L1CAM) mutációja által lehetséges. Az L1CAM egy olyan protein, mely fenntartja a sejt-sejt kapcsolatokat. Mutációja lecsökkenti az ENCC-k közti kapcsolatot és aganglionózishoz vezet (Anderson és mtsai., 2006b; Okamoto és mtsai., 2004). Az L1CAM (Anderson és mtsai., 2006b; Hackett-Jones és mtsai., 2011; Nagy és mtsai., 2012a). Ehhez hasonlóan az N-cadherin (Hackett-Jones és mtsai., 2011; Nagy és mtsai., 2012a) és az integrin család tagjainak ( $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ) (Breau és mtsai., 2006; Breau és mtsai., 2009a; Broders-Bondon és mtsai., 2012; McKeown és mtsai., 2013; Nagy és mtsai., 2009; Vohra és mtsai., 2006) funkcionális blokkolása rendellenes sejtadhézióhoz és migrációhoz vezet, amely Hirschsprung-betegségre jellemző fenotípust eredményez (Breau és mtsai., 2006; Breau és mtsai., 2009a; Nagy és mtsai., 2009). N-cadherin hiányos egérben is a bél ENCC kolonizációjának jelentős késése mutatható ki (Anderson és mtsai., 2006b; Broders-Bondon és mtsai., 2012).

Egy másik alapvető esemény a bélidegrendszer fejlődésében a legelől haladó sejtek irányított vándorlása. Ezt a folyamatot is az ENCC-k proliferációjának intenzitása és a sejtűrség határozza meg. A vándorlásban legelől haladó sejtek cranialis irányból a bél még benépesítetlen régiója felé vándorolnak, ahol a neurotrofikus szignálok nagyobb koncentrációban találhatók. Ahogy a sejtek sűrűsége növekszik, a bélfal eléri a maximális befogadóképességét, amely abban nyilvánul meg, hogy a specifikus neurotrofikus faktorok elérhetősége a kolonizáció előrehaladásával fokozatosan kimerül. Ezeknek a fejlődésbiológiai folyamatoknak a koordinálása nemcsak az ENCC-k által expresszált intrinsic faktoroktól, hanem az ENCC-k és az őket körülvevő mikrokörnyezet kölcsönhatásától függ.

### 1.3.1. RET jelátvitel szerepe a bélidegrendszer embryonális fejlődésében.

A bélidegrendszer fejlődésében részt vevő egyik legfontosabb útvonal a RET tirozin kináz transzmembrán receptor által mediált jelátviteli út, amely a bélidegrendszer fejlődése során nemcsak egy tulajdonságért felelős, hanem egymással látszólag össze nem függő jellemzők befolyásolására képes (pleiotróp hatásokkal rendelkezik). Majdnem az összes Hirschsprungos beteg kapcsolatot mutat a *RET* gént érintő mutációval (Gabriel és mtsai., 2002; Lyonnet és mtsai., 1993). A familiáris Hirschsprung esetek körülbelül 50%-ban és a sporadikus esetek 1/3-ában találtak *RET* mutációkat (Amiel és Lyonnet, 2001; Goldstein és mtsai., 2013; Hofstra és mtsai., 2000). A *RET* expressziójához a SOX10 (Southard-Smith és mtsai., 1998) és

a PHOX2B (Pattyn és mtsai., 1999) transzkripciós faktor szükséges; bármelyik hiánya teljes intesztinális aganglionózishoz vezet. A RET receptort a bél mesenchymában termelődő glia eredetű neurotrofikus faktor (GDNF) aktiválja, ami a RET és GFR-alpha-1 nevű ko-receptor komplexből áll. Ez a kötődés a RET foszforilációját váltja ki és számos sejten belüli útvonalat aktivál, ezek között megtaláljuk a RAS mitogén aktiválta protein kinázt (MAPK), a Jun asszociált N-terminál kináz (JNK) útvonalakat, valamint a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) által közvetített útvonalat is (Asai és mtsai., 2006). A szomiták mesenchyma sejtjeinek retinsav aktivitása nem csak a *RET* expressziót indukálja a pre-enterális ganglionléc sejtekben (Simkin és mtsai., 2013; Yamada és mtsai., 2007), hanem a PI3K aktivitást is fenntartja a vándorló ENCC-kben. A retinsav kitüntetett szerepe vezetett ahhoz a hipotézishez, hogy az A vitamin hiánya hozzájárulhat a Hirschsprung-kór etiológiájához (Fu és mtsai., 2010). Mivel a retinsav jelátvittele képes indukálni a *RET* expressziót és fenntartani a foszfatidil-inozitol-3-kináz aktivitást, ezért az elmúlt évek során egyre nagyobb hangsúlyt fektettek az A-vitamin hiány Hirschsprung-kórban betöltött szerepének tanulmányozására (Fu és mtsai. 2010, Simkin és mtsai., 2013). A GDNF-RET aktivitás negatív regulátorai az SPRY-2 (Taketomi és mtsai., 2005) és a KIF26A (Zhou és mtsai., 2009). Bármelyik két gén egyikének elvesztése szabályozatlan RET jelátvitelt, következésképpen bélidegrendszeri hiperpláziát okoz.

A migrációt támogató szerepén túl a RET aktivációja az ENCC prekurzorok túlélését és osztódását is elősegíti (Barlow és mtsai., 2003; Chalazonitis és mtsai., 1998; Hearn és mtsai., 1998; Heuckeroth és mtsai., 1998; Mwizerwa és mtsai., 2011; Soret és mtsai., 2020; Taraviras és mtsai., 1999). A *Ret*-hiányos egerekben az előbél területén található ENCC-ek fokozott apoptózisa (Taraviras és mtsai., 1999) tapasztalható. Az egereknél megfigyelt *Ret*, *Gdnf* vagy *Gfra1* hiány hozzájárul az intesztinális aganglionózis kialakulásához (Schuchardt és mtsai., 1994; Moore és mtsai., 1996; Pichel és mtsai., 1996; Sánchez és mtsai., 1996; Enomoto és mtsai., 1998). Transzgenikus egereken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a bélidegrendszer fejlődésében a RET hatása dóziszfüggő. Míg a homozigóta *Ret* deléciós egerek közel teljes aganglionózist mutatnak, addig a heterozigóta mutációk normál bélidegrendszerrel rendelkeznek (Schuchardt és mtsai., 1994). Amennyiben a *RET* expressziója a normál szint körülbelül 1/3-ára csökken colorectális aganglionózis alakul ki (Uesaka és mtsai., 2008). Mindez azt sugallja, hogy a *RET* expressziós szintje előre jelezheti a ganglionmentes szakasz hosszát. Ezen kívül mivel a GDNF rendelkezik egy kifejezett chemoattraktív hatással, így azt

feltételezik, hogy az is hozzájárul az ENCC-k bélben történő irányított migrációjához (Mwizerwa és mtsai., 2011a; Natarajan és mtsai., 2002; Young és mtsai., 2001). A *GDNF* először a gyomorban fejeződik ki, az ENCC-k ezzel egy időben az előbélien vándorolnak keresztül, később a coecumban található ekkor az ENCC-k a középbélben vannak (Natarajan és mtsai., 2002), ez az expressziós mintázat felveti annak lehetőségét, hogy a *GDNF* vonzza a sejteket és azért vándorolnak caudális irányba. Számos *in vitro* kísérlet igazolja, hogy a *GDNF* chemoattraktáns szerepet játszik az ENCC-k tenyésztésében (McKeown és mtsai., 2017; Nagy és Goldstein, 2006b; Young és mtsai., 2001).

A *GDNF*-RET jelátvitel azon kívül, hogy hatással van az ENCC migrációra, proliferációra és túlélésre, *in vitro* körülmények között az enterális neuronális differenciálódást is elősegíti (Chalazonitis és mtsai., 1998a; Hearn és mtsai., 1998). *In vivo* a *GDNF* differenciációra kifejtett hatása ellentmondásos. Embryonális madár bélben a *GDNF* retrovírus mediált elcsendesítése korai neuronális differenciálódáshoz vezet (Mwizerwa és mtsai., 2011). A *GDNF* heterozigóta egér szintén fokozott neurális differenciációt mutat (Flynn és mtsai., 2007). Ezzel ellentétben egyéb adatok viszont azt sugallják, hogy a *GDNF* jelátvitel hiánya gátolja a neuronális differenciációt és fenntartja a differenciálatlan ENCC-k populációját (Uesaka és mtsai., 2013). Ezek az ellentmondó megfigyelések kiemelten tükrözik a *GDNF*-RET jelátviteli út összetettségét, beleértve a RET aktivitás pleiotróp hatását és annak dóziszfüggőségét (Mwizerwa és mtsai., 2011; Soret és mtsai., 2020).

### 1.3.2. *EDNRB* jelátvitel.

Az endothelin receptor B (*EDNRB*) az ENCC-k által expresszált G-protein-kapcsolt molekula, aminek ligandja a bél mesenchymában termelt endothelin-3 (*EDN3*; 21 aminosavból álló peptid). Az *EDN3* vagy az endothelin konvertáló enzim-1-nek (*ECE1*) a deléciója colorectális aganglionózishoz vezet (Baynash és mtsai., 1994; Hosoda és mtsai., 1994). Humán Hirschsprung-kórban is azonosították az *EDN3-EDNRB* gének mutációját (Amiel és Lyonnet, 2001). *Edn3*<sup>-/-</sup> homozigóta mutációja a Shah-Waardenburg szindrómában is előfordul. Az *EDN3-EDNRB* jelátvitel elősegíti az ENCC-k proliferációját (Barlow és mtsai., 2003a; Nagy és Goldstein, 2006a) és gátolja a neuron irányú differenciálódást (Hearn és mtsai., 1998; Nagy és Goldstein, 2006a; Wu és mtsai., 1999). A jelátvitel hibája csökkenti az ENCC-k proliferációját és korai differenciálódáshoz vezet, aminek következtében a sejtek nem képesek vándorolni és a bélidegrendszer kolonizációja zavart szenved (Gershon, 1999). A bélidegrendszer fejlődése

során a RET és az EDNRB útvonalak közötti fennálló genetikai és molekuláris kapcsolatot több bizonyíték is alátámasztja. Például, míg a *Ret* heterozigóta egér és az *Ednrb* homozigóta egér (hipomorf *Ednrb* allél) normál bélidegrendszerrel rendelkezik, addig e két mutáció kombinációja aganglionózishoz vezet (Carrasquillo és mtsai., 2002; McCallion és mtsai., 2003). Sejtenyészetekben kimutatták, hogy a hozzáadott EDN3 fokozza a GDNF által indukált ENCC-k proliferációját (Barlow és mtsai., 2003a), viszont gátolja a differenciálódást (Hearn és mtsai., 1998). Érdekes módon a coecum eléréséig az ENCC-eknek nincs szükségük az EDNRB jelátvitelre (Druckenbrod és Epstein, 2005a), ez magyarázatul szolgál arra, hogy az útvonal kiesése kifejezetten colorectális aganglionózishoz vezet.

### 1.3.3. Transzkripciós faktorok (SOX10, PHOX2B, MASH1, HAND2).

A SOX10 egy HMG box-tartalmú transzkripciós faktor, amelyet a velőcsőről leváló ganglionléc sejtek kezdenek expresszálni és a vándorló ENCC-k is kifejezik. SOX10 expresszió elengedhetetlen az ENCC-k túléléséhez. *Sox10*<sup>-/-</sup> homozigóta mutáns egyedekben a ganglionléc-eredetű sejtek apoptózisa még azelőtt bekövetkezik, hogy megérkeznének az előbélbe és teljes intesztinális aganglionózis jön létre (Kapur, 1999). A SOX10 azon felül, hogy túlélési faktor, az EDNRB-hez hasonlóan (Bondurand és mtsai., 2006) ahhoz is szükséges, hogy az ENCC-ek differenciálatlan és proliferatív stádiumban maradjanak (Bondurand és mtsai., 2006; Nagashimada és mtsai., 2012; Paratore és mtsai., 2002). Miközben a *Sox10* null-mutáció teljes aganglionózist eredményez (Kapur, 1999), addig a heterozigóta mutánsokban idő előtti enterális neurogenézis (Okamura és Saga, 2008), ENCC progenitorok számának csökkenése és distalis aganglionózis figyelhető meg (Southard-Smith és mtsai., 1998). A bélidegrendszer fejlődését érintő jelátviteli útvonalak közt megfigyelt kölcsönhatások a *Sox10* mutánsok esetében is szerepet játszanak, ugyanis a SOX10 közvetlenül aktiválja a *RET* (Lang és mtsai., 2000) és az *EDNRB* (Zhu és mtsai., 2004) expresszióját. Amint az ENCC-ek neuronokká differenciálódnak megszűnik a SOX10 expressziójuk, de az enterális glia sejtek továbbra is kifejezik.

A paired-like homeobox 2b (PHOX2B) egy másik transzkripciós faktor, amit a leendő ENCC-k expresszálnak (Anderson és mtsai., 2006a). A PHOX2B az összes autonóm ganglion kialakulásához nélkülözhetetlen faktor, beleértve az enterális ganglionokat is. Kiemelt szerepe, hogy az ENCC-k proliferációját és túlélését támogassa; deléciója teljes intesztinális

aganglionózishoz vezet (Pattyn és mtsai., 1999). A SOX10-hez hasonlóan a PHOX2B is elengedhetetlen a *RET* expressziójához (Pattyn és mtsai., 1999). A 2. táblázat összefoglalja azok a géneket és növekedési faktorokat, receptorokat, amelyek mutációja felelősek lehetnek a bélidegrendszer fejlődési hibáiért.

**2. táblázat: A Hirschsprung-kór knockout egérmodellek (módosítva Zimmer és Puri 2015, után)**

Knockout egér	Gén	Funkció	Fenotípus
<i>Ret</i> <sup>-/-</sup>	<i>RET</i>	Tirozin-kináz receptor	Teljes intesztinális aganglionózis
<i>GDNF</i> <sup>-/-</sup>	<i>GDNF</i>	Glia eredetű neurotrofikus faktor	Teljes intesztinális aganglionózis
<i>Gfra1</i> <sup>-/-</sup>	<i>GFRA1</i>	GDNF receptor alpha 1	Teljes intesztinális aganglionózis
<i>Gfra2</i> <sup>-/-</sup>	<i>GFRA2</i>	GDNF receptor alpha 2	Hypoganglionózis
<i>Ntn</i> <sup>-/-</sup>	<i>NTN</i>	Neurturin, RET ligand	Hypoganglionózis
<i>EDN3</i> <sup>-/-</sup>	<i>EDN3</i>	Endothelin-3	Utóbél distalis szakaszának aganglionózisa
<i>Ednrb</i> <sup>-/-</sup>	<i>EDNRB</i>	Endothelin receptor B	Utóbél distalis szakaszának aganglionózisa
<i>Sox10Dom</i>	<i>SOX10</i>	Sry/HMG box transzkripció faktor	Teljes intesztinális aganglionózis
<i>Phox2b</i> <sup>-/-</sup>	<i>PHOX2B</i>	Paired-like homeobox 2	Teljes intesztinális aganglionózis
<i>Ihh</i> <sup>-/-</sup>	<i>IHH</i>	Indian hedgehog	Szegmentális aganglionózis
<i>SHH</i> <sup>-/-</sup>	<i>SHH</i>	Sonic hedgehog	Ektópikus neuronok a mucosában

A differenciálatlan ENCC-k *SOX10*-et és *PHOX2B*-t expresszálnak. Ez a két transzkripció faktor elnyomja egymás hatását, mely a bélben található neuron és a glia sejtek egyensúlyának fenntartásához egy nagyon fontos mechanizmus. Míg a neuronná alakuló sejtekben a *SOX10*, addig a glia sejtekben a *PHOX2B* kapcsolódik ki (Sasselli és mtsai., 2012).

A bélidegrendszer fejlődésében egy további jelentős transzkripció faktor a mammalian achaete-scute homolog 1 (*MASH1*; *ASCL1*), mely egy basic helix-loop-helix DNS kötő fehérje, és amit az előbélbe megérkező ENCC-k expresszálnak. A *MASH1* delécióna különösen



az oesophagus területén okozza az enterális neuronok hiányát (Guillemot és mtsai., 1993; Memic és mtsai., 2016).

A HAND2 az ENCC-ek által expresszált basic helix-loop-helix transzkripció faktor, mely a bél kolonizációjától kezdve expresszálódik és a neurogenesis későbbi stádiumaihoz (D'Autréaux és mtsai., 2007), valamint a neurotransmitter specifikációhoz szükséges (Lei és Howard, 2011). A HAND2 expressziójában bekövetkező csökkenés viszonylag enyhe hatást fejt ki a bélidegrendszer fejlődésére, de ez mégis jelentős fiziológiai következményekkel jár, mely megzavarja a bélmotilitást (D'Autréaux és mtsai., 2011). A HAND2 delécióval rendelkező egerekben a bélidegrendszer kolonizációja ugyan megtörténik, de a neuronális differenciáció károsodása, az enterális neuronok számának csökkenése és a nNOS, calretinin, és VIP termelő neuronok elvesztése következtében funkcionális aganglionózis alakul ki (D'Autreaux és mtsai., 2011; Lei és Howard, 2011).

#### 1.3.4. Epithélium eredetű faktorok (Netrin, Sonic hedgehog).

A mesenchymális morfogének mellett, epithél eredetű faktorok is kiemelt szerepet játszanak a bélidegrendszer fejlődésében (Roberts, 2000). A bél epithéliuma olyan morfogéneket (Netrin, Hedgehog fehérjék) szekretál, melyek direkt az ENCC-re hatnak, vagy indirekt módon a mesenchymális komponenseken keresztül fejtik ki hatásukat.

Az axonkinövés irányításában betöltött szerepéről ismert netrinek az intesztinális epithélium szekretálja, ami DCC (deleted in colon cancer) fehérjét expresszáló korai enterális neuronokra chemoattraktáns hatással van. A Netrin molekula támogatja a neuronok myentericus plexus régióból a submucosalis terület irányába történő centripetális migrációt (Jiang és mtsai., 2003; Seaman és mtsai., 2001). A DCC mutáns egerben a submucosalis plexus hiányzik (Jiang és mtsai., 2003). Annak ellenére, hogy a subepithelialis mesenchymában is igen erősen expresszálódik a Netrin fehérje, az ENCC-k mégsem kolonizálják a leendő lamina propriat, ennek feltehetően más gátló faktorok, beleértve az ECM komponenseinek a jelenléte lehet az oka.

*In vitro* hám-mesenchyma rekombinációs kísérletek igazolták, hogy a velőcső differenciálódása során a mesenchyma instruktív szerepe mellett a hám-eredetű faktorok is

elengedhetetlenül szükségesek a mesenchymális faktorok termelésében, a sejthálózatok és az extracelluláris mátrix mikrokörnyezetének kialakulásában. Például, a *BMP4*-nek (Bone morphogenetic protein) a bél submucosa területén megjelenő expresszióját a bélhámsejtekből szekretálódó Sonic hedgehog (SHH) növekedési faktor iniciálja (Roberts és mtsai., 1995; Roberts és mtsai., 1998). A BMP fehérjék, különösen a BMP2 és a BMP4 a bélidegrendszer fejlődés során sokrétű hatással rendelkeznek (Chalazonitis és Kessler, 2012). A BMP aktivitás szabályozza az ENCC migrációját (Fu és mtsai., 2006; Goldstein és mtsai., 2005a), valamint az enterális neuronok (Chalazonitis és mtsai., 2008) és a gliasejtek (Chalazonitis és mtsai., 2011) differenciálódását. Úgy tűnik, hogy a mesenchymában termelt BMP fehérjék fontos szerepet játszanak a neuronok és glia sejtek arányának meghatározásában. A BMP jelátvitel Noggin-nal történő gátlása növeli a teljes neuron számot (Chalazonitis és mtsai., 2008), míg a glia sejtek aránya csökken (Chalazonitis és mtsai., 2011). A BMP-k támogatják a gangliogenezist is, amelyben gangliont alkotó sejtek aggregálódnak, és ez magában foglalja a NCAM (neural cell adhesion molecule) molekula expressziós változását is (Faure és mtsai., 2007; Fu és mtsai., 2006; Goldstein és mtsai., 2005a).

A Hedgehog növekedési faktor családba tartozó SHH fehérjét két évtizede azonosították először gerinces állatokban, valamint emberben. Nemsokkal később a **Hedgehog** család két másik tagját: az Indian hedgehog (IHH), valamint a Desert hedgehog (DHH) is leírták. Az *SHH* és *IHH* az embryonális fejlődés kezdetén a gerinchúrnban, majd később a végtagbimbókban és a bélcső entodermájában fejeződnek ki és a mesenchymára fejtik ki hatásukat. 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. Mint a legfontosabb organizátor molekula, az SHH kiemelt szerepet játszik a csigolyák, arc, pancreas, nemszervek organogenezisében is. Mutációja esetén leggyakoribb fenotípusok a holoprosencephalia (rendellenes koponya), brachydactylia (rövid ujjpercek), csigolyák hiánya, nyelőcső sipoly (fistula oesophago-trachealis), cloaca malformatio (Riddle és mtsai., 1993; Sasai és mtsai., 2019). Rágcsálókban az *Ihh* gén mutációja szegmentális aganglionózissal társul (Ramalho-Santos és mtsai., 2000), de a gén bélidegrendszer kialakulásában betöltött pontos szerepe még nem tisztázott. A *SHH* különböző modellrendszerekben végzett expressziós tanulmányai ellentmondásos eredményeket hoztak. *In vitro* egér enterális idegsejtek proliferációját nagymértékben

serkenti a tápoldatba oldott SHH fehérje (Fu és mtsai., 2006). Ezt támasztják alá a zebraahal embryokon kapott adatok is, ahol a SHH serkentette a ganglionléc sejtek vándorlását és proliferációját (Reichenbacha és mtsai., 2008). Hedgehog mutáns egerekben a bélidegrendszer rendellenesen fejlődött; ganglionmentes szakaszok és ectopikus ganglionok alakultak ki (Ramalho-Santos és mtsai., 2000).

A hedgehog szignálút vonal a célsejten lévő Patched-1 (PTC1) nevű receptorához való kötődésével veszi kezdetét, amely ezután a Smoothened-Gli kaszkádon keresztül aktiválja a transzkripciót. Genome-wide asszociációs tanulmányokkal Hirschsprung-betegekből izolált sejteben is azonosították a PTC1 és a GLI gének mutációját (Ngan és mtsai., 2011, Wang és mtsai., 2013, Liu és mtsai., 2015). Ezek a kísérletek ugyanakkor nem mutattak rá, hogy a SHH közvetlenül a ganglionléc sejtekre hat vagy a bél mesenchyma sejtek differenciálódásának szabályozása révén vesz részt a normális bélidegrendszer kialakításában. Mindezen adatok alapján feltételeztük, hogy a bélidegrendszer gyakori veleszületett elváltozásainak megjelenésében a hámeredetű faktorok is fontos szerepet játszhatnak, és erre alkalmas lehet a **Sonic hedgehog** morfogén.

### 1.3.5. Az extracelluláris mátrix szerepe a bélidegrendszer normál és patológiás fejlődésében

A mesenchymalis és epithelialis eredetű növekedési faktorokon kívül a bél mesenchymájában termelt extracelluláris mátrix (ECM) is szoros összefüggésben van a bélidegrendszer fejlődésével, illetve a veleszületett neurointesztinális betegségek rendellenességeivel. Korai Hirschsprungos egérmodelleken végzett bélidegrendszer fejlődésével kapcsolatos tanulmányokban többször is abnormális ECM expressziót figyeltek meg. Továbbá, a hedgehog fehérjék a forkhead transzkripció faktorok (FOXF1 és FOXF2) mesenchymális expresszióját is aktiválják. A FOXF expresszió inaktiválása az I-es és a IV-es típusú kollagén jelentős csökkenését és colorectális aganglionózist okoz (Ormestad és mtsai., 2006). Edn3 null-mutáns egér ganglionmentes szegmensében a laminin, a IV-es típusú kollagén, a perlecan és más proteoglikánok megnövekedett expresszióját figyelték meg és ez felvetette annak a lehetőségét, hogy az ECM megváltozott összetétele hozzájárulhat a ganglionmentes fenotípus kialakulásához (Payette és mtsai., 1988; Rothman és mtsai., 1996; Tennyson és mtsai., 1990). Hasonló hipotézis vetődött fel humán Hirschsprung biopsziákon végzett megfigyelések alapján, amely gyakran emelkedett laminin expressziót mutatott a

ganglionmentes szegmens területén (Parikh és mtsai., 1992). A közelmúltban többször kimutatták, hogy az ECM molekulák egy komplex és dinamikus molekuláris vázat alkotnak, amely egyszerre biztosít mechanikai felszín és szolgál fontos szignálként az ENCC-k migrációjához és ezen keresztül szabályozzák a bélidegrendszer fejlődését. Az intesztinális ECM magában foglalja a glikoproteineket (pl.: laminin, fibronectin, tenascin), kollagéneket és proteoglikánokat, melyek az ENCC-k felületén expresszált receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat (Nagy és mtsai., 2009; Newgreen és Hartley, 1995; Simon-Assmann és mtsai., 1986). Ganglionléc specifikus *Ednrb* mutáns egerekben a 36/67 kDa laminin receptor csökkentése együtt jár a ganglionmentes fenotípus kialakulásával (Fu és mtsai., 2020). A komplex ECM molekulák befolyásolják az ENCC sejtek polaritását, vándorlását, proliferációját, differenciálódását, ganglionokká aggregálódását és plexusokká rendeződését, ezért nem meglepő, hogy a bél ECM összetétele meghatározó szerepet játszik az ENS fejlődésében. Mindezek ellenére az ECM összetételének és expressziós mintázatának változása a bélidegrendszer normál (ganglionléc sejtek bevándorlása előtt, idején, illetve a kolonizációt befejező differenciálódási folyamatokban) és patológiás fejlődése kapcsán alig ismert.

A bélidegrendszer fejlődésének szabályozása során az enterális ganglionléc-eredetű sejtek migrációjához szükséges fizikai felszín biztosításán túl az ECM molekulák fontos szignálként is szolgálnak (Perris és Perissinotto, 2000). Emlősökben jelenleg közel 300, „matrisome”-nak nevezett ECM alkotásában részt vevő proteint azonosítottak. A matrisome magában foglalja az ECM mindhárom fő komponensét, a kollagéneket (> 43), a proteoglikánokat (~36) és a glikoproteineket (~200) (Hynes és Naba, 2012). A laminin (Nagy és mtsai., 2009), a fibronectin (Akbareian és mtsai., 2013), a vitronectin (Breau és mtsai., 2009a) és az I-es típusú kollagén (Nagy és Goldstein, 2006a) *in vitro* támogatja az ENCC vándorlását. Ezzel ellentétben a VI-os típusú kollagén gátolja a GDNF-mediálta ENCC migrációt (Soret és mtsai., 2015). *In vitro* a kondroitin-szulfát proteoglikánok (CSPGs) szintén gátló hatást fejthetnek ki a vándorló ganglionléc sejtekre (Dutt és mtsai., 2006b; Ring és mtsai., 1996; Szabó és mtsai., 2016). A legtöbb pro-migrációt serkentő ECM molekula széles körben eloszlik a fejlődő bél mesenchymájában, beleértve a lamina propriát is, ahol egyébként az ENCC-k normál esetben nem telepednek meg. Kollagén VI és a CSPG-k kifejezetten a ganglionléc sejtektől mentes submucosalis mesenchymában fejeződnek ki (saját megfigyelés). Következésképpen, az enterális plexusok koncentrikus elhelyezkedését olyan extracelluláris

molekuláknak kell szabályoznia, amelyek a vándorló ENCC-kre nem megengedő környezetet teremtenek vagy kifejezetten gátló hatást fejtenek ki.

Ezek alapján úgy tűnik, hogy a neurális plexusok fejlődése során a permisszív és a non-permisszív ECM fehérjék közti határ fontos szereppel bír a radiális mintázat kialakulása szempontjából.

Egy nemrégiben készült tanulmány során célzott mutagenézissel állítottak elő olyan egeret, amely a kollagén-6 $\alpha$ 4 gén ENCC specifikus fokozott expressziójával rendelkezett. Az ENCC-k által termelt VI-os típusú kollagén fehérje megnövekedett szintje meggátolta a fibronectin sejtmigrációt serkentő hatását és ezáltal jelentősen lecsökkent az ENCC-k vándorlásának sebessége (Soret és mtsai., 2015). Az ENCC-k mátrix metalloproteázokat (MMP) is szekretálnak, amelyeknek a mesenchymális ECM lebontásában és újjáalakításában van szerepük (Chevalier és mtsai., 2016). Az ENCC eredetű MMP-ok jelentőségét egy olyan tanulmányban bizonyították, amely során embrionális bélexplantátumban gátolták az MMP2 aktivitását, ami az ENCC vándorlásában és a neurális hálózat kialakulásában is súlyos zavarokhoz vezetett (Anderson, 2010). Ezek a megfigyelések kísérletesen igazolják, hogy az ENCC-k aktív szekrécióval képesek változtatni mikrokörnyezetüket a vándorlás során.

#### **1.4. A madár embryo szerepe a bélidegrendszer tanulmányozásában**

Az „optimális” fejlődésbiológiai modellek kiválasztásánál az embryológusok számára mindig kiemelt szempont volt a könnyű hozzáférhetőség, olcsó fenntarthatóság, gyors embrionális fejlődés, mikrosebészeti manipulálhatóság, a kísérletes beavatkozásokkal szembeni ellenállóképesség. Az utóbbi években egyre nagyobb szerepet kaptak azok a madárembryokon végzett embryomanipulációs és sejtjelölési kísérletek, amelyekben nyomon követhető egy sejtípus eredete, vándorlása, differenciálódása. Nem toxikus festékek (fluoreszkáló carbocianin anyagok; Serbedzija, 1991; Nagy és Goldstein, 2006a), sejtvonali specifikus monoklonális ellenanyagok (Milstein, 1999) vagy csirke-fürj és GFP-t (green fluorescent protein) kifejező transzgenikus csirke embryok rekombinációjával létrehozott kimérák (Dóra és mtsai., 2018; Dóra és mtsai., 2017; Le Douarin, 2004; Nagy és mtsai., 2012; Teillet és mtsai., 1999) alkalmazása lehetővé tette egy-egy kérdéses sejtvonali sorsának tanulmányozását, sorstérképek készítését. Hybridoma technika alkalmazásával lehetőség nyílt

specifikus monoklonális ellenanyagok előállítására és a differenciálódó sejttípusok fejlődésbiológiai vizsgálatára pl. ganglionléc, izom, endothél, hemopoietikus sejtek és azok utódsejtjeire (Bódi és mtsai., 2009; Gumati és mtsai., 2003; Igyarto és mtsai., 2008; Nagy és mtsai., 2001a; Nagy és mtsai., 2001b). Csirke-fürj kimérák alkalmas eszközt jelentettek annak meghatározására, hogy a csíralemezek sejtjei milyen szervek kialakulásához járulnak hozzá. Ugyanakkor a már fejlődésnek indult szervtelepek transzplantációjával tisztázható az egyes sejttípusok eredete, sorsa. Talán legtöbbit a ganglionléc eredetű őssejteket vizsgálták, de ugyancsak kimérákkal igazolódott a végtagizmok myotom eredete, a bordák szklerotom eredete, a hemopoietikus sejtek intraembryonális eredete, a bursai dendritikus sejtek és a lép fehérpulpájának fibrocyta eredete (Brand-Saberi és Christ, 2000; Catala és mtsai., 1995; Huang és Christ, 2000; Le Douarin és mtsai., 2000; Nagy és Goldstein, 2006a; Nagy és Goldstein, 2006b; Nagy és mtsai., 2001a; Nagy és mtsai., 2005; Nagy és mtsai., 2007). Csirke-fürj kimérával bizonyították először, hogy a bélidegrendszer sejtjei nem *in situ*, az emésztőszerv mesenchymális állományában alakulnak ki, hanem bevándorolnak a fejlődő embryonális bélcsőbe (Le Douarin és Teillet, 1973).

Habár a klasszikus embryomanipulációs technikáknak köszönhetően a madár embryo fontos szerepet tölt be a fejlődésbiológiai kutatásokban, fejlődésgenetikai vizsgálatok szempontjából mégis jelentős hátrányba szorult. Ennek egyik oka, hogy az emlős és kétéltű embryokban kivitelezhető célzott mutációkat, null-mutáns állatokat madarakban nem lehetett előállítani. Az elmúlt években leírt újszerű génmanipulációs módszerek (retrovírus-technika, elektropráció, CRISPR/Cas9 génszerkesztés) alkalmazásával viszont már madár embryokban is előidézhető célzott funkcióvesztéses és funkcionyeréses mutáció. Ezek az újítások ismét előtérbe helyezték a madár embryot, hiszen az egerekben kivitelezhető transzgenikus technikák rendszerint költséges és időigényes módszerek. A null-mutáns egerek többsége embryonálisan letális, a transzgenikus embryoba pedig mikrosebészetiileg nem lehet beavatkozni. Lu és munkatársai kimutatták, hogy a piggyBac transzpozon elektroporációval hatékonyan integrálható a csirke embryo genomjába (Lu és mtsai., 2009). Az elmúlt évtizedekben különféle módszereket dolgoztak ki a csirke embryok genetikai manipulálására, ideértve az idegen DNS-konstrukciók elektroporációját, a transzdukciót retrovírusokkal és a közelmúltban a korábban ismert módszereknek a CRISPR / Cas9 rendszerrel való kombinációját (Gandhi és mtsai., 2017). A transzgen madár embryonális sejtekbe, szervtelepekbe juttatásának lehetséges módszere a virális vektorok alkalmazása. Az első

ismert és egyben széleskörűen alkalmazott retrovírus, a madarakat fertőző Rous-sarcoma vírusból módosított replikáció-kompetens Rous-asszociált vírus (RCAS). Az RCAS retrovírusokba tetszőleges gének klónozhatók, így ez a módszer jól alkalmazható pl. transzkripció és növekedési faktorok fejlődésbiológiai funkciójának vizsgálatára, továbbá ez a technika a funkció-vesztő mutációk, az RNS-interferencia módszerével is kombinálható (Bourikas és mtsai., 2005; Das és mtsai., 2006; Goldstein és mtsai., 2005b; Logan és Tabin, 1998; Mwizerwa és mtsai., 2011b; Nagy és mtsai., 2016). A fejlődésbiológiai kutatások az újszerű génmanipulációs módszereket ötvözve az embryosebészeti technikákkal részletesen vizsgálták a végtagok, szőr, központi idegrendszer, szomiták, ganglionléc sejtek korai fejlődését szabályozó molekuláris kölcsönhatásait, viszont a fejlődő bélidegrendszert befolyásoló hám-mesenchyma-ganglionléc kölcsönhatások szerepére vonatkozóan csak kevés adattal rendelkezünk.

## 2. 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 embryok 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 egérembryok esetében a plexus submucosus csak a születés után jelenik meg.

Célkitűzéseink a következők voltak:

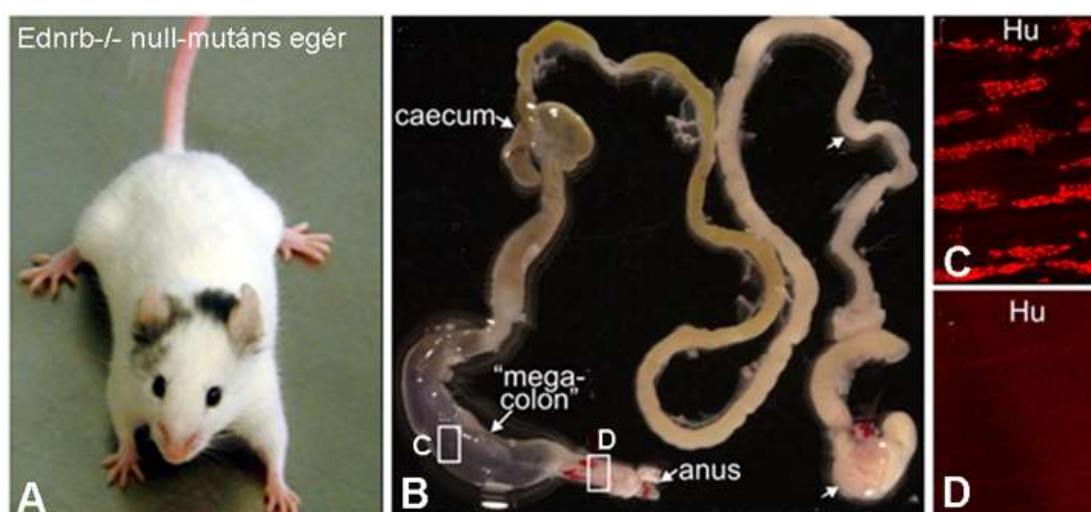
1. A ganglionléc-eredetű őssejtek vándorlásának és differenciálódásának karakterizálása, embryomanipulációs kísérletekkel történő nyomon követése a vastagbél idegrendszerének ontogenezise során.
2. Hogyan vesz részt a sacralis velőcső szakaszból származó ganglionléc a vastagbél idegrendszerének embryonális 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.



### 3. MÓDSZEREK

#### 3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteink során csirke (*Gallus gallus domesticus*, White Leghorn típus), fürj, (*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 fel. A transzgenikus GFP-t (green fluorescent protein) expresszáló csirketojásokat Prof. Helen Sang jóvoltából a skóciai Roslin Intézetből (University of Edinburgh, Edinburgh, UK) kaptuk. A fejlődési kor meghatározására a Hamburger-Hamilton stádiumokat (Hamburger és Hamilton, 1951), vagy az embryonális kort (E) alkalmaztuk. A csirketojásokat laboratóriumunk keltetőgépeiben 38 °C-on inkubáltuk. Az endothelin receptor B (*Ednrb*<sup>-/-</sup>) (*Ednrb*<sup>tm1Ywa/J</sup>; JAX#003295) null mutáns, Tau<sup>GFP/+</sup> [*Tau (Mapt)* KO (ebben a transzgenikus egérben az összes neuron fluoreszcensen jelzett), JAX#004779], *Col18*<sup>-/-</sup> (kollagén XVIII null mutáns), *Plp1*<sup>GFP</sup> (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, Boston, USA) laboratóriumából szereztük be.



**5. Ábra: Endothelin receptor B (EDNRB) KO egér.** A-B.) Az *Ednrb* homozigóta mutáns egér a humán Hirschsprung-kor állatmodelljének felel meg: pigmenthiányos bőr és distalis megacolon jellemzi. C,D.) neuron specifikus anti-Hu immunfluoreszcens festés a distalis colorectum aganglionozisát mutatja.

### 3.2. Sejtvonalak

A ganglionléc sejtek vándorlását extracelluláris mátrixfehérjékkel (laminin, fibronectin) előkezelt felületen vagy a következő tápláló sejtréteggel bevont tenyésztőedényekben követtük nyomon: humán hepatóma HepG2 (ATCC® HB-8065™) sejtvonal, transzformált csirke embryonális fibroblast (DF1; UMNSAH/DF1 ATCC® CRL. 12203™), humán endothél sejtek. A primér humán endothél sejttenyészeteket (Huvec), kollagenáz emésztés után kimosással, köldökvénákból alapítottuk. A kísérletekben saját alapítású csirke fibroblast sejtvonalat és simaizom sejtek primer sejttenyészetét is felhasználtunk (Nagy és mtsai., 2001). A sejttenyészeteket 10% FCS-t (Fetal Calf Serum, Sigma), glutamint, esszenciális aminosavakat, 100 U/ml penicillin-t és 0,1 mg/ml streptomycin-keveréket tartalmazó DMEM-ben (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) tenyésztettük. A sejteket  $\beta$ 1 integrint blokkoló (klón: CSAT) monoklonális ellenanyaggal (Testaz és mtsai., 1999; 20  $\mu$ g/ml), vagy kontrollnak azonos izotípusú madárellenes B lymphocytá ellenanyaggal BoA1-vel (20  $\mu$ g/ml, Igyarto és mtsai., 2008) kezeltük. Korai és enterális ganglionléc sejteket 2, 5, illetve 7 napos csirke embryokból nyertük.

### 3.3. A minták szövettani feldolgoása

Szövettani vizsgálatokhoz teljes embryokat, embryonális bélszakaszokat és felnőtt állatokból származó vékony és vastagbelet használtunk. Immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatok céljából a szervekből zselatinos-fagyasztott blokkokat készítettünk. **Zselatinos-szacharózos fagyasztott blokk készítése:** A kipreparált szerveket 1 órán keresztül 4%-os paraformaldehidben (PFA) fixáltuk, majd ezt követően egy éjszakán át 15%-os szacharózban (Molar Chemicals Kft., 02200-203-190) inkubáltuk, majd 7,5%-os zselatin (Fluka, 04055) oldatban impregnáltuk, végül folyékony nitrogénnel -50°C-ra hűtött izopentánban (2-metilbután, Sigma-Aldrich, M32631) lefagyasztottuk.

### 3.4. Immuncitokémia

Az immuncitokémiai vizsgálatainkat poly-L-lysine-nel (Sigma, P8920) bevont tárgylemezre felvett 12 µm-os fagyasztott metszeteken végeztük. **Immunhisztokémiai festés:** a fagyasztott metszetekből a zselatint kioldottuk, majd ezt követően a metszetekre rámértük a primer ellenanyagokat (2. táblázat) és 45 percig inkubáltuk. A következő lépésben a metszetekre szekunder ellenanyagot (3. táblázat) mértünk és további 45 percig szobahőmérsékleten és nedves kamrában inkubáltuk. PBS-ben (1-szeres) történő mosás után az ABC komplexet (avidin-biotin-peroxidáz komplex, Vectaststain Elite PK-6100; Vector Laboratories) vittük fel a metszetekre és fél órán át inkubáltuk. Az ellenanyagokhoz kötődött peroxidáz enzim aktivitását 4-chloro-1-naftollal detektáltuk (Sigma, C8890). **A teljes szervi („whole mount”) immunfestést, metszés nélkül,** embryonális béldarabokon végeztük. A primer ellenanyagot második lépésben peroxidázzal jelzett anti-egér IgG szekunder ellenanyaggal (Vector) jelöltük és diamino-benzidin (DAB, Sigma) kromogénnel tettük láthatóvá az immunreakciót. **Immunfluoreszcencia:** A primer ellenanyagokkal kezelt metszetek inkubálása szobahőmérsékleten, fénytől védett, nedves kamrában történt. A biotinilált szekunder ellenanyagok bekötődésének detektálására PBS-ben hígított (1:100) fluorókrómmal konjugált szekunder ellenanyagot használtunk. A sejtmagok kimutatására DAPI (4,6 diamino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, D1306) reagenst használtunk.

#### 2. táblázat: Az immunfestés során felhasznált primer ellenanyagok.

Ellenanyag (klón) neve	Ellenanyag izotípusa	Felismert sejttípus, struktúra, molekula	Hígítás	Beszerzési forrás, katalógusszám
8F3	Egér IgG1	Csirke specifikus citoplazma antigén	1:2	DSHB
Agrin	Poliklonális kecske	Egér extracelluláris mátrix	1:100	R&D System (AF550)
Agrin	Egér IgG1	Egér extracelluláris mátrix	1:10	Millipore (Mab5204)

Agrin (6D2)	Egér IgG1	Csirke extracelluláris mátrix	1:5	DSHB
Alpha-smooth muscle actin (1A4)	Egér IgG2a	Simaizom marker	1:400	DAKO (M0851)
AMV-3C2	Egér IgG1	RCAS retrovírus tokfehérje	1:5	DSHB
Beta-dystroglycan (43DAG1/8)	Egér IgG2a	Agrin receptor	1:50	Leica Biosystems (NCL-b-DG)
B-fabp	Poliklonális nyúl	Glia marker	1:50	Kurtz és mtsai., 1994
BrdU (G3G4)	Egér IgG1	Osztódó sejtek	1:2	DSHB
CD57 (HNK-1)	Egér IgM	Csirke ENCC	1:50	NeoMarkers (MS-1163-R7)
cleaved caspase-3	Poliklonális nyúl	Apoptótikus sejt	1:50	Cell Signaling (9064)
CN	Egér IgG1	Csirke specifikus neuron marker	1:10	Dr. Hideaki Tanaka szívességéből (Tanaka és mtsai., 1990)
E-cadherin (36)	Egér IgG2a	Epithel sejt	1:200	BD Bioscience (610181)
Endosztatin	Poliklonális kecske	Humán extracelluláris mátrix	1:40	R&D System (AF1098)
Endosztatin (1092)	Poliklonális nyúl	Egér extracelluláris mátrix	1:100	Dr. Takako Sasaki szívességéből, (Sasaki és mtsai., 1998)

Fibrillin 2-like (JB3)	Egér IgG1	Csirke extracelluláris mátrix	1:10	DSHB
Fibronectin (B3/D6)	Egér IgG2a	Csirke extracelluláris mátrix	1:5	DSHB
GFAP	Poliklonális nyúl	Glia marker	1:300	DAKO (Z0334)
Heparán- szulfát proteoglikán (33, 33-2)	Egér IgG1	Csirke extracelluláris mátrix	1:5	DSHB
HuC/HuD (16A11)	Egér IgG2a	Neuron marker	1:100	Invitrogen (A-21271)
Kollagén I (DD4/F12)	Egér IgG2a	Csirke extracelluláris mátrix	1:2	Dr. Thomas F. Linsenmayer szívességéből, (Birk és mtsai., 1988)
Kollagén I (I- 8H5)	Egér IgG2a	Csirke extracelluláris mátrix	1:1000	MP Biomedicals (631701)
Kollagén III (3B2)	Egér IgG1	Csirke extracelluláris mátrix	1:10	DSHB
Kollagén IV (IF8)	Egér IgG2a	Csirke extracelluláris mátrix	1:2	Dr. Thomas F. Linsenmayer szívességéből (Fitch és mtsai., 1990)
Kollagén IX (2B9)	Egér IgM	Csirke extracelluláris mátrix	1:2	DSHB

Kollagén VI (39)	Egér IgG1	Csirke extracelluláris mátrix	1:5	DSHB
Kollagén XVIII (6C4)	Egér IgG1	Csirke extracelluláris mátrix	1:2	DSHB
Kollagén XVIII (NC1)	Poliklonális nyúl	Egér extracelluláris mátrix	1:300	Dr. Takako Sasaki szívességéből, (Sasaki és mtsai., 1998)
Kollagén XVIII (NC11)	Poliklonális nyúl	Egér extracelluláris mátrix	1:1000	Dr. Takako Sasaki szívességéből, (Sasaki és mtsai., 1998)
Kondroitin-szulfát proteoglikán (CS-56)	Egér IgM	A natív CSPG glükózaminoglikán részét	1:2000	Sigma (C8350)
L1-CAM (8D9)	Egér IgG1	Csirke ENCC	1:5	DSHB
Laminin	Poliklonális nyúl	Egér extracelluláris mátrix	1:200	Abcam (ab11575)
Laminin (31, 31-2)	Egér IgG1	Csirke extracelluláris mátrix	1:40	DSHB
MEP21 ( $\alpha$ -chicken podocalyxin)	Egér IgG1	Csirke endothel sejt	1:200	Kelly McNagy szívességéből, (McNagy és mtsai., 1997)
N-cadherin (6B3)	Egér IgG1	Csirke ENCC	1:20	DSHB
Neurofilament (4H6)	Egér IgG1	Neuron marker	1:10	DSHB
p75	Poliklonális nyúl	Csirke ENCC	1:700	Weskamp és Reichardt, 1991

p75	Poliklonális nyúl	Egér ENCC	1:300	Promega (G3231)
Perlekán (5C9)	Egér IgG1	Csirke extracelluláris mátrix	1:5	DSHB
PHOX2B	Tengerimalac IgG	ENCC és neuron prekursor	1:500	Dr. Hideki Enomoto szívességéből, (Nagashimada és mtsai., 2012)
PTC1	Poliklonális kecske	Patched fehérje N-terminusa	1:20	Santa Cruz (sc-6149)
QCPN	Egér IgG1	Fürj specifikus perinukleáris antigén	1:2	DSHB
QN	Egér IgG	Fürj specifikus neuron marker	1:10	Dr. Hideaki Tanaka szívességéből (Tanaka és mtsai., 1990)
Ret	Kecske IgG	Egér specifikus ENCC	1:25	Neuromics (GT15002)
SHH	Poliklonális nyúl	Sonic hedgehog fehérje N-terminusa	1:400	Santa Cruz (sc-9024)
SHH (5E1)	Egér IgG1	Sonic hedgehog fehérjét szekretáló sejtek	1:2	DSHB
Sox10	Egér IgG1	Csirke ENCC	1:10	Rehberg és mtsai., 2002
SOX10 (20B7)	Egér IgG1	ENCC és glia prekursor	1:50	Thermo Fisher (14-5923-80)

Tenascin-C (M1B4)	Egér IgG1	Csirke extracelluláris mátrix	1:10	DSHB
Tuj1 (B1195)	Egér IgG2a	Neuron marker	1:200	Covance (MMS-435P)
Versican (core protein in the V0 and V2 isoforms of versican)	Poliklonális nyúl	Extracelluláris mátrix	1:500	Dr. Steve Hoffman szívességéből, (Zanin és mtsai., 1999)
Versican (GAG $\alpha$ domain in the core protein of the V0 and V2 isoforms)	Poliklonális nyúl	Extracelluláris mátrix	1:200	Dr. Maria T. Dours-Zimmermann szívességéből, (Dutt és mtsai., 2011)
Versican (GAG $\beta$ domain in the core protein of the V0 and V1 isoforms)	Poliklonális nyúl	Extracelluláris mátrix	1:500	Dr. Maria T. Dours-Zimmermann szívességéből, (Landolt és mtsai., 1995)



**3. táblázat: Az immuncitokémia során felhasznált szekunder ellenanyagok.**

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

**4. táblázat: Fluorokrómmal konjugált szekunder ellenanyagok (Invitrogen-Life Technologies, Merck):**

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

kecskében készült anti-egér IgG2b ( $\gamma$ 2b)	488	Invitrogen-Life Technologies	A-21141
kecskében készült anti-egér IgG2b ( $\gamma$ 2b)	594	Invitrogen-Life Technologies	A-21145
kecskében készült anti-egér IgM ( $\mu$ lánc)	488	Invitrogen-Life Technologies	A-21042
kecskében készült anti-egér IgM ( $\mu$ lánc)	594	Invitrogen-Life Technologies	A-21044
kecskében készült anti-nyúl IgG (H+L)	488	Invitrogen-Life Technologies	A-11008
kecskében készült anti-nyúl IgG (H+L)	594	Invitrogen-Life Technologies	A-11012
szamárban készült anti-egér IgG (H+L)	546	Invitrogen-Life Technologies	A-10036
szamárban készült anti-egér IgG (H+L)	647	Invitrogen-Life Technologies	A-31571
szamárban készült anti-kecske IgG (H+L)	488	Invitrogen-Life Technologies	A-11055
szamárban készült anti-nyúl IgG (H+L)	488	Invitrogen-Life Technologies	A-21206
szamárban készült anti-nyúl IgG (H+L)	546	Invitrogen-Life Technologies	A-10040
szamárban készült anti-tengerimalac IgG (H+L)	647	Millipore	AP193SA6

### 3.5. Sejtosztódás kimutatása bromodeoxyuridine (BrdU) és 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) jelöléssel

A proliferáló sejtek azonosítására bromodeoxyuridin-t (BrdU) használtunk, amely az osztódó sejtek újonnan szintetizálódó DNS-ébe épül be. A beépülő BrdU specifikus ellenanyagokkal kimutatható. Az embryonális szerveket fixálás előtt 37°C-on 3 óráig BrdU oldatban inkubáltuk. A fluoreszcensen jelölt BrdU specifikus ellenanyag rámérése után a metszeteket sötét helyen 45 percig inkubáltuk. A BrdU pozitivitást mutató sejtek szoftveres számolási adat alapján kerültek megállapításra, ami átlagosan 20 metszet alapján készült el. A csoportok közötti statisztikai szignifikancia értékeléséhez páros t-tesztet használtunk. Amennyiben több, mint két csoportot hasonlítottunk össze, a statisztikai szignifikanciát ANOVA teszttel állapítottuk meg. Az eltéréseket  $P < 0,05$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

Újabban a sejtproliferáció mértékének meghatározásához 5-ethynyl-2'-deoxyuridine-t (EdU) használtunk. Ezzel a módszerrel kiváltható az ellenanyag alapú detektálás. Az embryonális szervekhez vagy a tenyésztőmédiához 2 órával a fixálást megelőzően 10  $\mu\text{M}$  EdU-t adtunk. Az EdU beépülését Click-iT EdU Imaging Kit (Invitrogen) segítségével mutattuk ki.

### 3.6. *In situ* hibridizáció

Az *in situ* hibridizációt teljes embryokon vagy 10  $\mu\text{m}$  paraffinos metszeteken végeztük, digoxigeninnel jelölt „próbákkal”, amelyek a következők voltak: *SHH*, *PTC1*, *PTC2*, *Endothelin-3*, *GDNF*. A paraffinos metszeteket deparaffináltuk és ethanol sorozatban rehidráltuk. A metszetek permeabilizálását Proteinase K (Sigma) kezeléssel végeztük 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  koncentrációban 10 percig, majd 3 x 5 percig PBT-ben (1x Tween20 / 1 x PBS) való mosást követően 4%-os PFA-ban 20 percen keresztül fixáltuk a metszeteket. Következő lépésként 0,1x TEA (triethanolamine-hydrochloride, Sigma) pufferben lévő ecetsavas-anhidridben (Sigma) inkubáltuk 10 percig és egy újabb PBT mosás után a metszeteket 2 órán keresztül 70°C-on hibridizációs pufferben (50% de-ionizált formamid (Promega), 5 x SSC pH 5,0, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  élesztő tRNS (Sigma), 1% SDS és 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  heparin (Sigma)). A metszeteket a „próbákban” 70 °C-on egy éjszakán át rázatva (100 rpm) inkubáltuk, majd 2 mM tetramizol-hidrokloriddal (Sigma) mostuk. A blokkolást 2% -os blokkoló reagensben (Roche Life Science) / 5% juh-szérumban / 5% kecske

szérumban végeztük 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd 1: 2000 arányban anti-Digoxigenin-AP antitestet (Sigma) tartalmazó oldatban állni hagytuk 2 órán át szobahőmérsékleten. Levamisolos PBT-ben való mosást követően, lúgos foszfátáz pufferben (2 x 5 perc mosás) equilibráltuk a metszeteket, majd a BM Purple oldattal (Roche Life Science) végeztük az előhívást.

### 3.7. Western-blot

Az embryonális béltraktust lizáló-pufferben emésztettük (76,5 mM Tris, 2% SDS, 10% glicerin) majd ezt követően homogenizáltuk (Sonic Dismembrator Model 500; Fisher Scientific). A fehérjekoncentrációt Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Billerica, MA) és Victor2 1420 Multilabel számláló (Perkin-Elmer Life Sciences, Waltham, MA) segítségével határoztuk meg. A lizátumokat 5 percig 95 ° C-on főztük, 7,5% vagy 10%-os Mini protean TGX előgyártott gélekre töltöttük (Biorad, Waltham, MA), majd PVDF membránra (Biorad) vittük át. Az immunoblottolást nem redukáló körülmények között végeztük. A tenascin-C (1: 125), laminin (1: 125) és fibronectin (1: 1000) ellenanyagok kötődését kecske anti-egér HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal (Biorad; 1: 5000), Immun-Star HRP luminol/HRP peroxid pufferrel (BioRad) mutattuk ki.

### 3.8. PCR

A teljes mRNS-t RNeasy Mini Kit-el (Qiagen) izoláltuk. A cDNS-t a Superscript III reverz transzkripció készlettel (Invitrogen) szintetizáltuk. A génexpressziós szinteket kvantitatív PCR-rel (qPCR) mértük, belső standardként *GAPDH*-val. Alkalmazott primerek (5'→3'): *EDN3*, TGCGTCTACTACTGCCACCTC és CCAAACAAGAGCACCGAAAT; *GDNF*, TCTCCACCTCACCCCTG és CTGGGTAATCCTCTGGCATATTAG; *GAPDH*, GTGCTAAGCGTGTTATCATCTC és GACAACCTTGGCATTGTGGA.

### 3.9. Metszetek értékelése, fényképezése, képfeldolgozás

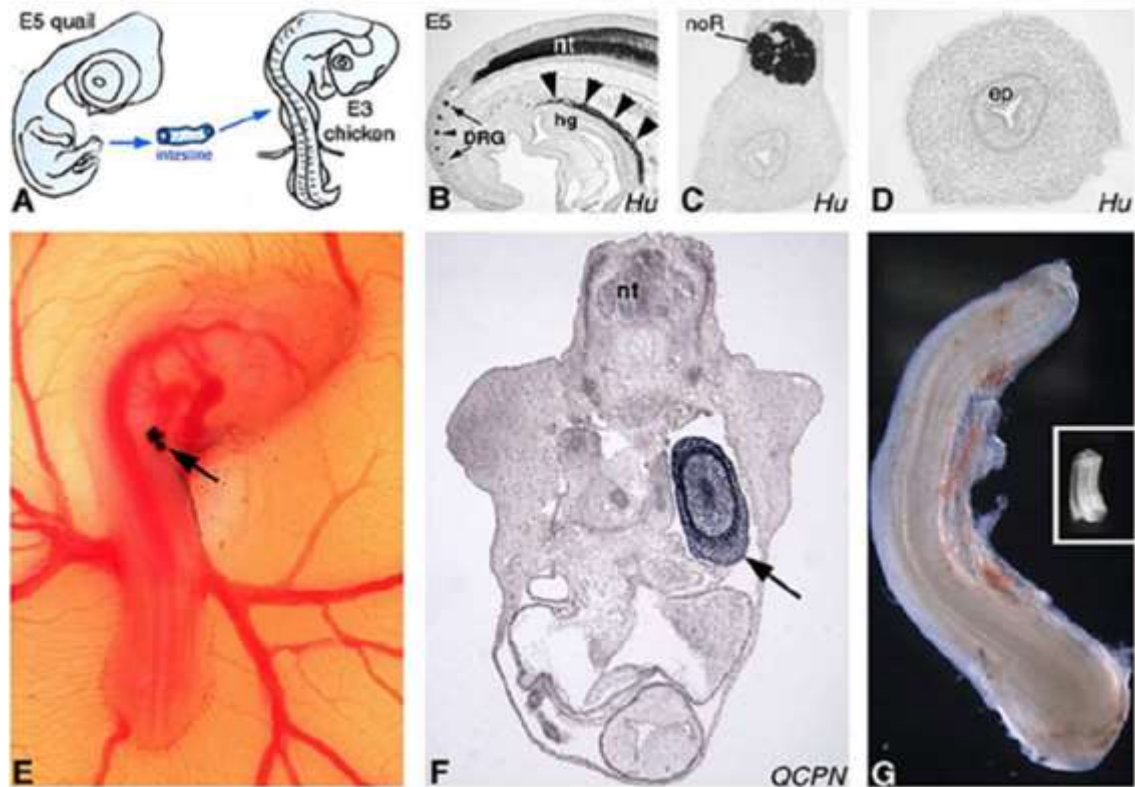
A metszeteket Zeiss Axiophot, Nikon i80, Olympus mikroszkópokkal értékeltük és a hozzá csatlakoztatott kamerával (Zeiss AxioCam HCR, illetve Spot) különböző nagyításokon digitális képeket készítettünk. A konfokális fotókat Zeiss LSM 710 típusú mikroszkóppal készítettük. A képek későbbi tanulmányozását, szerkesztését ImageJ (National Institutes of Health) és Adobe Photoshop szoftverekkel végeztük.

### 3.10. Embryomanipulációs módszerek:

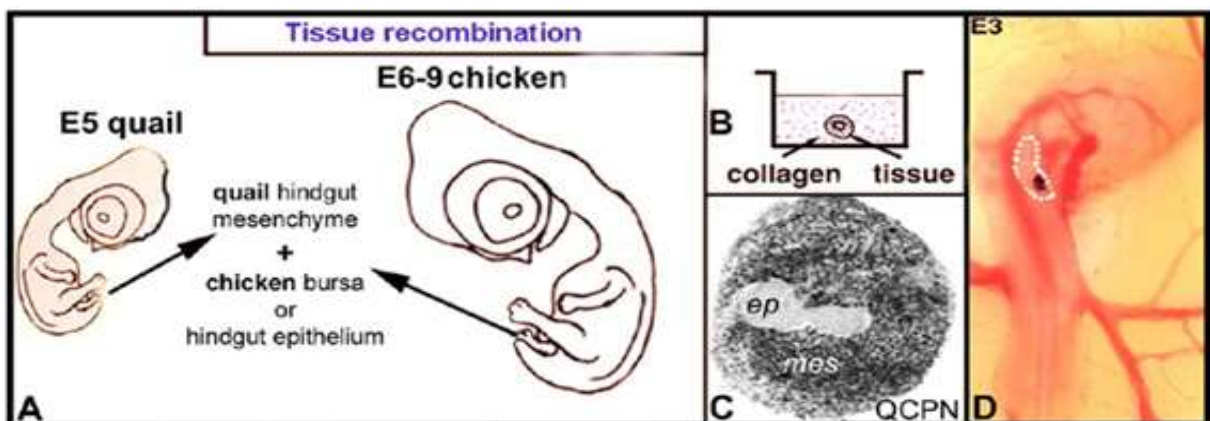
#### 3.10.1. Csirke-fürj, fürj-csirke, csirke-egér, csirke-patkány embryonális testüreg kimérák:

A testüregkimérák alkalmasak az embryonális szervek hosszú távú *in vivo* tenyésztésére. A testüreg kimérákat a nyirokszervek fejlődésének kísérletes tanulmányozásánál leirtak szerint állítottuk össze (Nagy és mtsai., 2004; 2005). Emlős embryok esetében 11,5 napos egér és patkány embryokból kiperarált utóbélről eltávolítottuk a coecumot, majd a preganglionotikus (ganglionléc mentes; aneurális) utóbélszakaszt steril szénszemcsével történő megjelölést követően 3 napos (HH18 stádiumú) csirke embryo testüregébe transzplantáltuk. A transzplantáció után a tojás héját átlátszó ragasztószalaggal zártuk és a kimérákat tovább inkubáltuk 7-14 napig.

Hám-mesenchyma rekombinációs kísérletekben a 5-8 napos csirke embryo eredetű bélentodermát, illetve bursa epitheliumot rekombináltuk 5 napos fürjembryok utóbél mesenchymájával. A rekombináció előtt a szöveteket 0,03%-os kollagenázzal enzimatikusan és saját készítésű wolframkésekkel microsebészeti úton elválasztottuk egymástól. A rekombinált embryonális szöveteket 12 óráig kollagénapú 3D-gél szervtenyészetben inkubáltuk, hogy a szövetek közötti integritás újra létrejöjjön, majd a rekombinált szövetet 3 napos embryo testüregébe ültettük és 10-14 napig inkubáltuk (7. ábra).



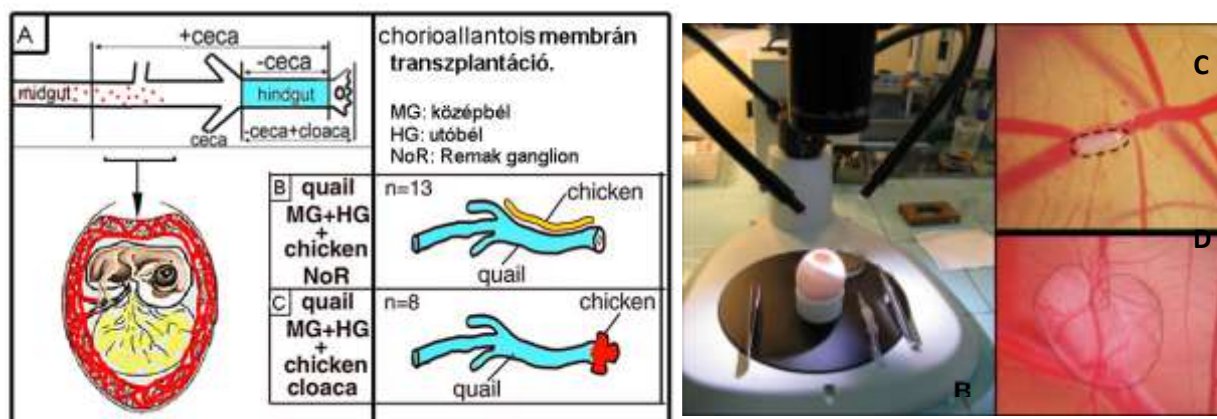
**6. ábra: Testüreg kiméra I. A.)** A fürj, csirke vagy emlős embryokból származó vastagbélszakaszokat 3 napos csirke embryok testüregébe ültettük és a kiméra embryokat 7-14 napig inkubáltuk. **B-D.)** A transzplantált preganglionotikus szövetek 24 óra alatt vaszkularizálódnak, ganglionléc sejtekkel kolonizálódnak, és elindul a szöveti differenciálódásuk. **E.)** A graftokat szénszemcsével jelöltük meg. 3 napos csirke embryo: a graft a szív mögött található primitív testüregbe 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.



**7. ábra: Testüreg-kiméra II. A.)** Hám-mesenchyma rekombináció sémás rajza. Különböző fajkból származó epithelio-mesenchymális szervek szöveti rekombinációját követően a mesterséges szerveket kollagén alapú tenyészetekbe **(B, C)** tartottuk és 24 órával később **(D)** testüregbe ültettük.

### 3.10.2. Chorioallantois membrán transzplantáció:

A chorioallantois membrántranszplantáció alkalmas arra, hogy nagyobb méretű embryonális szerveket vagy *in vitro* rekombinált szöveteket hosszabb ideig *in vivo* körülményekhez hasonló miliőben tenyészük. A kísérletek során mindig 9 napos csirke embryok chorioallantois membránjára transzplantáltuk a szöveteket, majd a csirke és fűrj embryokból származó bél és cloaca szakaszokat 7-9 napig tenyésztettük. Az embryonális **szervrekombinációs kísérletekben** a fűrj és csirke embryoból származó cloaca és vastagbélszakaszokat *in vitro* rekombináltuk. Ezt követően a rekombinált szerveket a 9 napos csirke embryo chorioallantois membránra történő transzplantáció előtt 24 órát kollagén gélbe ágyazva inkubáltuk, hogy létrejöhessen a különböző fajokból származó szövetek adhéziója (8. ábra).



**8. ábra: Chorioallantois membránon (CAM) történő embryonális béltenyésztés. A.)** Az 5E embryoból kipreparált utóbélszakaszokat 9 napos fűrj vagy csirke embryo chorioallantois membránján *in ovo* tenyésztjük. **B.)** A tojánhéj és a héjhártya felynitása után sztereomikroszkóp alatt a graftokat „Y” alakú érelágazás felületére transzplantáltuk. Az érelágazásra kiültetett graft morfológiája a kísérlet elején **(C)**, illetve a vaszkularizálódott graft makroszkópos képe 7 nappal a transzplantációt követően **(D)**.

### 3.10.3. Microgyöngy embryonális transzplantációja (9. ábra).



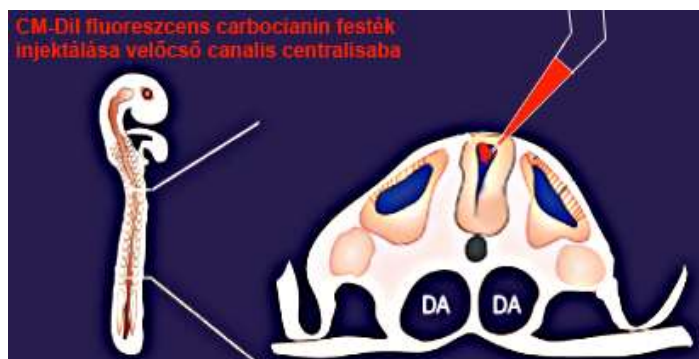
9. ábra

Sejtek, szövetek differenciálódását befolyásoló faktorok tanulmányozására olyan hordozókat használhatunk, amelyek segítségével a növekedési faktorokat lokálisan a kívánt helyre lehet az embryoba bejuttatni. A baloldali fotón 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  $\mu\text{m}$  átmérőjű heparin-acril mikrogyöngyöket (Sigma) EDN3, GDNF, SHH növekedési faktorok oldatába, valamint BQ788 (EDN3 jelátvitelt gátolja) és anti-GDNF funkcióblokkoló ellenanyag steril oldatába 4-12 órát áztattunk. Az előkezelt mikrogyöngyöket az 5 napos embryoból izolált vastagbél mesenchymális falába implantáltuk, 72 óráig tenyésztettük, vagy testüregkimérákat készítve embryonális testüregbe transzplantálva további 7 napig inkubáltuk.

### 3.10.4. Carbocianin-alapú vitális sejtjelölés (10. ábra).

Vybrant CM-Dil (Life Technologies) fluoreszcens carbocianin oldatot 2 napos (HH10-11 stádium) csirke embryok velőcsővének canalis centralisába injektáltunk. Ezzel a módszerrel a velőcsőből kivándorló ganglionléc sejteket jelöltük meg.

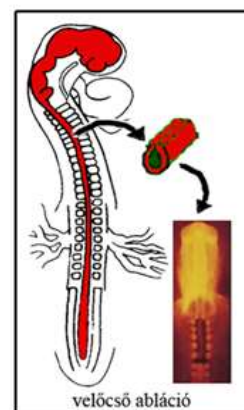


10. ábra: CM-Dil fluoreszcens carbocianin festék injektálása a velőcső canalis centralisába.



### 3.10.5. Velőcső eltávolítása microsebészeti módszerekkel (11. ábra).

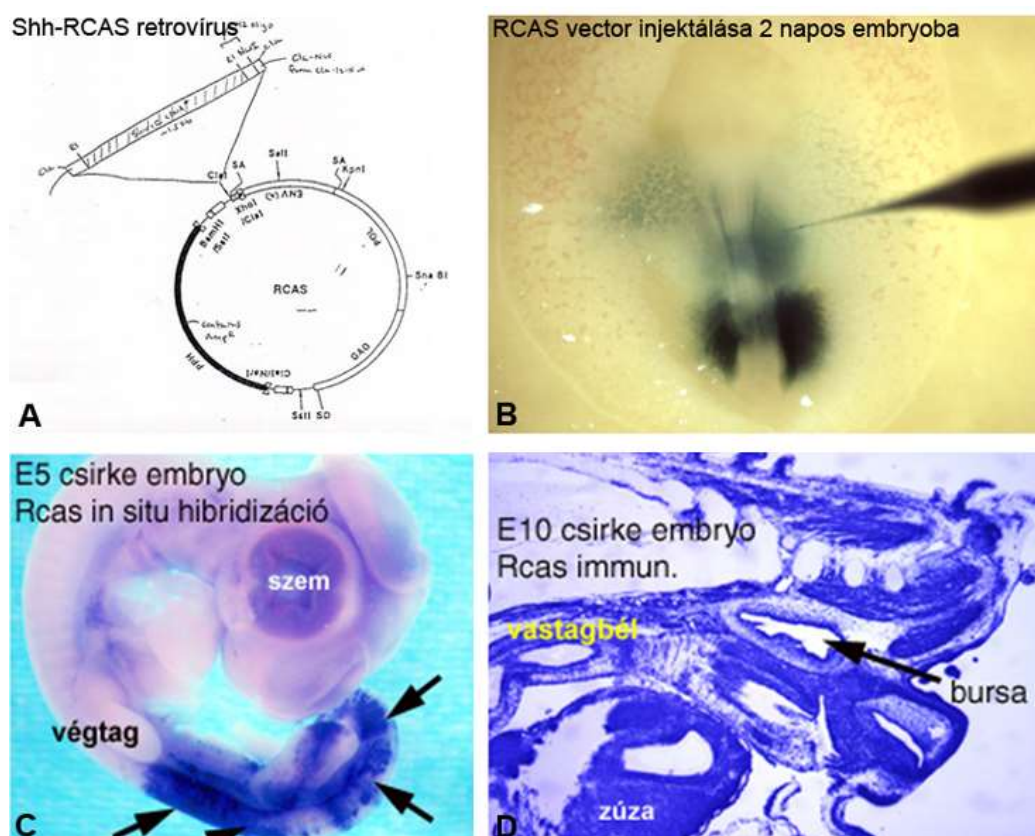
A velőcső ablatios kísérletek alkalmasak a neurocristopathiak fejlődésének kísérletes tanulmányozására. A kísérlet során steril körülmények között felnyitott HH11 stádiumú csirke embryon vágást ejtünk a velőcső két oldalán, 0,03%-os kollagenáz kezelést követően (20 perc, 37 °C) a velőcsövet kiemeljük (megtartva a gerinchúrt) és az embryokat kikelésig inkubáljuk.



11. ábra

### 3.10.6. Csirke embryoban történő funkciónyeréses és funkcióvesztéses mutációk kiváltása replikáció-kompetens RCAS retrovírusokkal.

Az utóbbi években egyre nagyobb szerepet kaptak az olyan újszerű génmanipulációs módszerek alkalmazása (retrovírus-technika, elektroporáció), amelyek segítségével madár embryokban is előidézhető génmutáció (Iba, 2000). Retrovírus vektorok segítségével madár embryokban célzott funkció-nyerő és funkció-vesztő mutációt lehet létrehozni. Erre kifejezetten alkalmasak az olyan retrovirális vektorok, amelyek madarakat megfertőző Rous-sarcoma vírusból módosított, replikáció-kompetens vírusokból (RCAS) készítenek (von Werder és mtsai., 2012; Yan és Wang, 2012). Az RCAS-okban az RNS a genetikai anyag és ezt egy reverz transzkriptáz szintetizálja DNS-sé. Az RCAS retrovírusokba tetszőleges gének klónozhatók önállóan, illetve egy meglévő markergénnel (GFP) együtt (12. ábra, A kép). Ez a módszer jól alkalmazható transzkripciós vagy növekedési faktorok, receptorok, adhézis molekula és egyéb jelátviteli molekula fejlődésbiológiai funkciójának vizsgálatára. A módszer lényege röviden: az E. coli törzsekben felszaporított retrovírus plazmidot DF1 embryonális fibroblast sejtvonalon tenyésztettük, majd az ultracentrifugálással bekoncentrált víruspartikulumokat korai csirke embryok vastagbéltelepének mesenchymájába injektáljuk (12. ábra, B kép). A vírus embryoba történő injektálása 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 márkájú mikroinjektorhoz rögzített 100 µl-es Hamilton fecskendő segítségével, vékony üvegapillárison keresztül 5 napos embryok vastagbéltelepébe 2-5 µl SHH-RCAS retrovírus szuszpenziót vagy Cyclopamine-t (3 µM) injektáltunk (12. ábra, C, D kép).



**12. ábra: RCAS retrovirus intraembryonális injektálása.** A.) SHH-RCAS retrovirus 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.

### 3.11. Sejt-, szerv-, és embryotenyészetek

#### 3.11.1. Az enterális idegi őssejtek izolációja, felszaporítása és *in vitro* differenciáltatása.

A felnőtt idegi őssejtek *in vitro* tenyésztéséhez 3 hetes *Wnt1;tdT* vagy *Plp1GFP* és *Tau<sup>GFP/+</sup>* egérből származó, a disszociálást követően, tdT valamint GFP expresszió alapuló fluoreszcens sejt-szorterral (BD ACSaria III) kiválogatott sejtekből indultunk ki. A *Wnt1;tdT* egerek vékonybél LMMP rétegéből izoláltuk a tenyésztéshez és sejtranszplantációhoz szükséges sejteket. A bélszövetet enzimatikusan diszpázzal (250 µg/ml; StemCell Technologies, Vancouver, BC) és a kollagenázzal XI (1 mg/ml; Sigma) emésztettük; 40 µm-es szűrőn izoláltuk, és 50 000 sejt/ml koncentrációban tenyésztettük, mely Neurocult egér alapműmediumot (StemCell Technologies) tartalmazott, 10% Neurocult egér proliferációs kiegészítéssel (StemCell Technologies), 20 ng/ml epidermális növekedési faktor (StemCell Technologies), 10 ng/ml fibroblast növekedési faktor (StemCell Technologies), 0,0002% heparin (StemCell Technologies). 7 nap tenyésztés után primer sejtaggregátumokat (neurosphere) kaptunk.

### 3.11.2. Velőcső és bélcső tenyésztés.

A ganglionléc sejtek migrációját E5 (HH26) középbél és E2 (HH15) velőcső tenyésztésével vizsgáltuk. Korai ganglionléc sejtek kinyerésére csirke embryokból (HH15, korai két napos embryo) 3–20 szomiták szintjéről II-es típusú diszpáz enzimmel (2 mg/ml DMEM-ben; Roche) történő kezelést követően izoláltuk a velőcsövet együtt a paraxiális mezoderzával (Bronner-Fraser, 1986; Newgreen és Murphy, 2000). Több PBS-es mosás után a velőcsövet wolfrámtúkkal microsebészeti módszerre kipreparáltuk és fibronectinnel (20 µg/ml; Sigma) vagy lamininnel (10 µg/ml; Sigma) bevont műanyag szövettenyésztő edényekre helyeztük (13. ábra, A kép).

### 3.11.3. Kollagén alapú 3D szervtenyésztés.

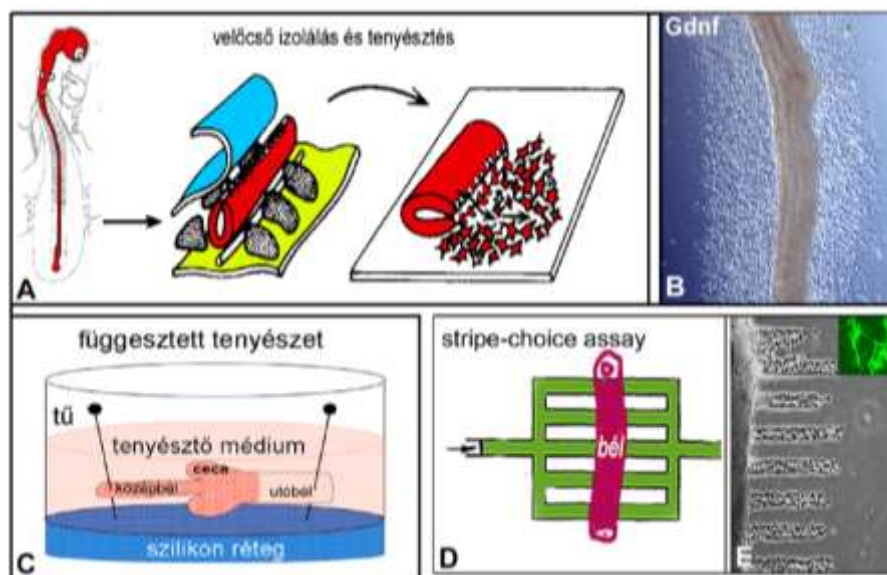
Kísérleteink során az 5 napos embryokból izolált középbélet és utóbélet tartalmazó bélszakaszt I-es típusú kollagén alapú mátrixba (BD Biosciences, 354236) ágyazva 48-72 óráig tenyésztettük. A tenyésztést Falcon Center-Well Organ Culture Dish típusú tenyésztőedényekben végeztük. A kollagén gélbe oldva a SHH növekedési faktor (R&D Systems, Recombinant mouse SHH, 461-SH-025; 1 µg/ml); SHH-funkció blokkoló ellenanyag (klón: 5E1; 50 µg/ml; DSHB), SHH jelátvitel inhibitorának a cyclopamine-nak (Toronto Research Chemicals Inc.; 1-3 µM), VEGF blokkoló SU5416 (1 µM; Calbiochem), valamint a mesenchymalis eredetű GDNF-nek (R&D Systems, Recombinant Human GDNF, 212-GD-010; 10 ng/ml) hatását vizsgáltuk (13. ábra, B. kép).

### 3.11.4. Függeszett 3D szervtenyésztés.

A függeszett szervtenyésztések elkészítéséhez az embryonális csirke és egérembryoból izolált bélszakaszokat steril körülmények közt, penicillin-streptomycint tartalmazó PBS-be gyűjtöttük. A béldarabokat rovartűk segítségével a steril, szilikonnal bevont petricsészék aljzatához rögzítettük úgy, hogy a körülöttük lévő folyadékban lebegjenek, s ne tapadjanak a szilikonhoz. A kontroll tenyésztést PenStrep-et tartalmazó DMEM-ben 37 °C-os 5 % CO<sub>2</sub> termosztátban végeztük. A SHH jelátvitel hatásának tanulmányozására 2 µg/ml koncentrációjú rekombináns egér SHH fehérjét adtunk a tenyésztő oldathoz és a szerveket 48-72 órát tenyésztettük (13. ábra, C kép).

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

Az enterális ganglionléc-eredetű sejtek *in vitro* vándorlásának tanulmányozására Yamagishi kutatócsoportja által leírt módszert alkalmaztuk (Yamagishi és mtsai., 2016). Prof. Martin Bastmeyer (Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Németország) által rendelkezésünkre bocsájtott szilikon matricák segítségével műanyag tenyészedényre 90 µm szélességű sávokban 10 µg/ml laminin (Sigma), 20 µg/ml fibronectin (Sigma), 2 µg/ml agrin (R&D Systems) vagy 50 µg/ml endosztatin (R&D System) vittünk fel. Az ECM sávokra merőleges orientációban (13. ábra, D, E kép) 7 napos csirke embryoból származó középbelet helyeztünk, majd a tenyészethez 10 ng/ml GDNF tartalmú DMEM-et adtunk. Az enterális ganglionléc-eredetű sejtek migrációs képességét Chakraborty munkacsoportja által leírtak szerint is megismételtük (Chakraborty és mtsai., 2015). A *Wnt1;tdT*-eredetű idegi sejtaggregátumokat 20 µg/ml fibronectinnel bevont felületen szérum-mentes DMEM-ben, illetve 20 µg/ml funkcióblokkoló agrin antitestet (Millipore, MAB5204) tartalmazó médiumban tenyésztettük. A sejt-vándorlást ImageJ (National Institutes of Health) szoftver segítségével mértük. A látóteret 8 mezőre osztottuk, melyekben az idegi sejtaggregátum határa és az attól legmesszebb található *Wnt1;tdT* sejt közötti távolságot mértük.

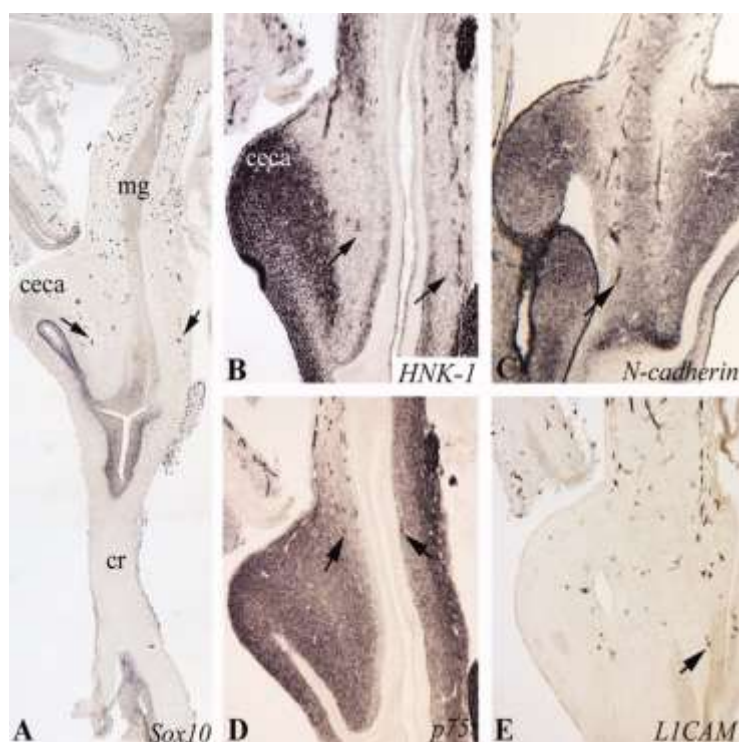


**13. ábra: Embryonális sejt-, és szervtenyészetek.** A.) Ganglionléc sejtek izolálása velőcsőből és tenyésztése ECM-el bevont felszínen. B, C.) Embryonális bél 3D kollagén alapú mátrix és függesztett 3D szervtenyésztete. D.) *In vitro* sejt-migrációs teszt („stripe-choice assay”). Az ECM sejt-migrációra 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 inverz mikroszkópos felvétele.

#### 4. EREDMÉNYEK

##### 4.1. A velőcső vagus szakaszából származó ganglionléc-eredetű sejtek vándorlása és differenciálódása a csirke embryo vastagbél idegrendszerének fejlődése során.

Habár a madár embryo alkalmas modellnek tekinthető az idegrendszert célzó kutatásokban, a bélidegrendszer differenciálódásának tanulmányozása, részletes immuncitokémiai karakterizálása eddig még nem történt meg. Kísérleteink során, első lépésben 5-14 napos csirke embryok fejlődő bélidegrendszerének immuncitokémiai karakterizálását végeztük el. Elsősorban olyan markereket teszteltünk, amelyek az emlős (rágcsáló, humán) embryokban a ganglionléc, neuron és a glia sejteket specifikusan jelölik. Fagyasztott hosszanti metszeteken immuncitokémiai módszerekkel követtük nyomon a ganglionléc sejtek bél falban történő vándorlását és glia, valamint neuron irányú differenciálódását. A vagus régióból származó cranio-caudalis irányba haladó enterális ganglionléc-eredetű sejtek (ENCC) 6 napos embryonális korban (E6; Hamburger-Hamilton stádium HH28) érkeznek a coecum területére. A legelől vándorló sejtekre SOX10, HNK-1, N-cadherin, p75 és L1CAM expresszió jellemző (14. ábra).



**14. ábra: Ganglionléc eredetű sejtek 6 napos embryóban kolonizálják a coecum telepét.**

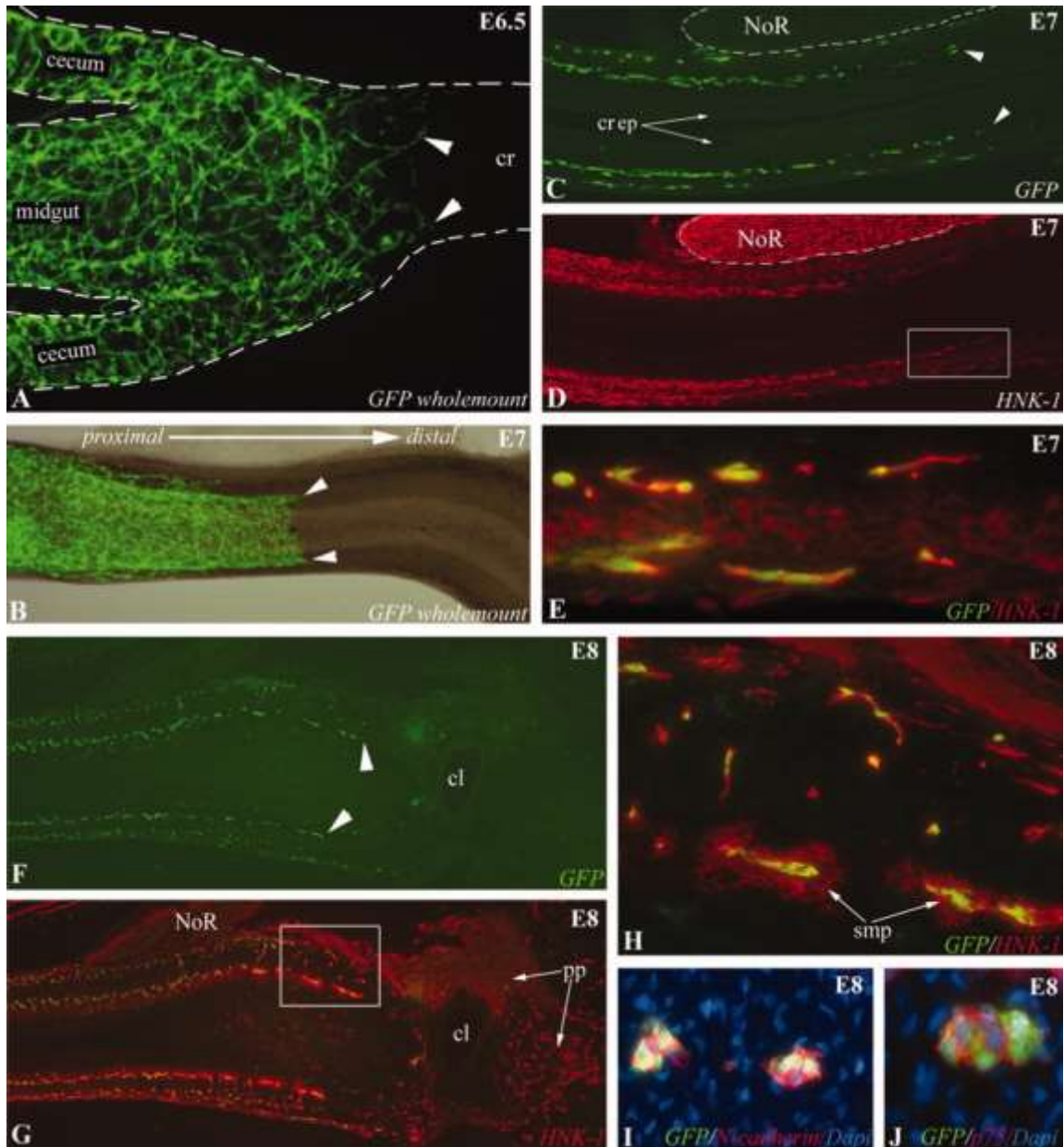
**A.)** E6 (HH28) középbél és utóbél hosszanti sorozatmetszetének SOX10, **(B)** HNK-1, **(C)** N-cadherin, **(D)** p75 és **(E)** L1CAM immunjelölése. A legelől vándorló sejtek (nyilak) közvetlenül a vastagbél felett, a coecum magasságában találhatóak. A HNK-1, N-cadherin és p75 immunjelölést a coecumban kifejezett mesenchymális háttérfestődés kíséri. mg, középbél; cr, utóbél.



Az 5-6 napos embriók immuncitokémiai jelölésének hátránya az, hogy a ganglionléc-eredetű sejtekre jellemző HNK-1, N-cadherin és p75 ellenanyagokkal történő immunhisztokémiai festés ebben a fejlődési stádiumban a coecumban kifejezetten erős mesenchymális háttérexpressziót mutat (14. ábra, B-D), ami jelentősen megnehezíti a ganglionléc sejtek elkülönítését a környező sejtektől. Ezzel szemben a SOX10 és L1CAM jelöléssel háttérfestés nem fordul elő, ezért ezzel a két markerrel követtük a ganglionléc-eredetű sejtek belépését a coecum területére, amint rostro-caudalis irányú migrációt folytatva a terminális középbél területén át, az utóbél irányába haladnak.

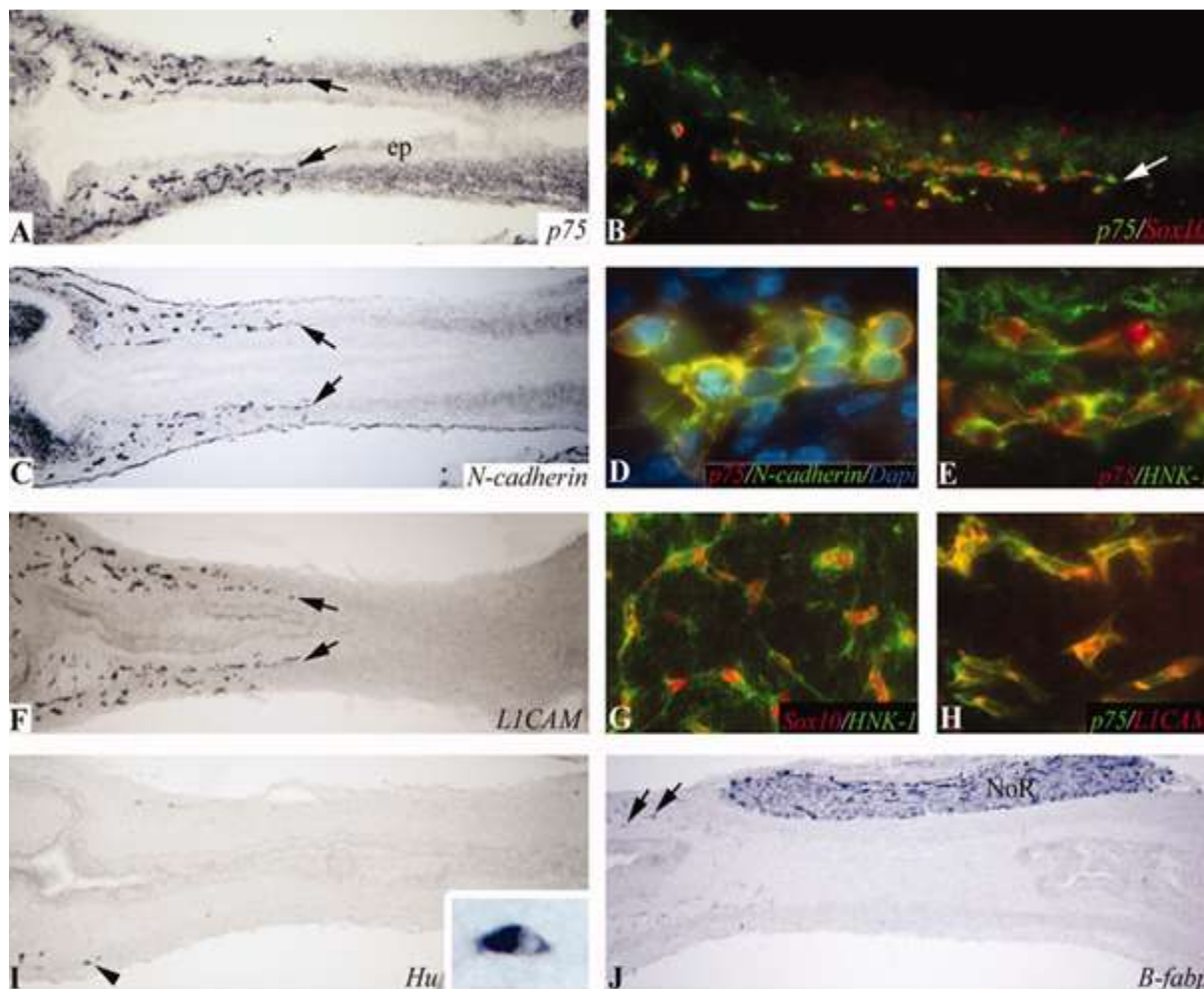
A utóbelet kolonizáló ganglionléc-eredetű sejtek azonosítására és a legelől vándorló sejtek meghatározására E1.5 embrionális korú (10. Hamburger-Hamilton stádium, HH10) transzgenikus GFP (green fluorescent protein) csirke embrió 2-6 szomiták magasságából származó velőcső szakaszát azonos korú csirke embrióba transzplantáltuk. Ezzel olyan embrionális kimérát hozunk létre, amiben a ganglionléc sejteket genetikai markerrel (GFP) jelöltük meg. A GFP expresszió nyomon követésére frissen kiperarált, fixálatlan szövetekben kifejezett GFP+ fluoreszcenciát vettük figyelembe. E6.5 (HH29) stádiumban a legelől vándorló GFP+ sejtek a coecumot elhagyva lépnek be az utóbél proximális területére (15. ábra, A), míg 7 napos embrióban (HH30) a utóbél középső szakaszát is benépesítik (15. ábra, B-D). Mivel a Remak-ganglion a sacralis velőcsőből származó ganglionléc-ből képződik, GFP expressziót nem mutatott (15. ábra, C).

A kiméra szövet immunfluoreszcens tanulmányozása során megfigyeltük, hogy a sejtfelszíni HNK-1 immunreaktivitás mintázata hasonló a GFP-vel megfigyelt sejtek eloszlásához (15. ábra, D). Továbbá, a legelől vándorló összes GFP+ sejt expresszálja a HNK-1-et, ami igazolja, hogy ez a ganglionléc sejtekre leírt ellenanyag specifikusan jelöli a legelől vándorló, differenciálatlan ENCC-t (15. ábra, E-H). E8 stádiumra (HH32) a GFP+ ENCC-k kolonizálják a cloaca területét (15. ábra, F). Várakozásunknak megfelelően a plexus pelvicus és a Remak-ganglion HNK-1+ sejtjei GFP-t nem fejeztek ki, ami utal ezeknek a struktúráknak sacralis ganglionléc eredetére (15. ábra, G, H). Az immunfluoreszcencia festés igazolta, hogy a HNK-1 molekula mellett, az N-cadherin sejtadhéziós molekulát (15. ábra, I) és a p75 alacsony affinitású neurotrofikus receptort (15. ábra, J) is expresszálják az utóbél idegrendszerének GFP+ sejtjei. E7 stádiumban (HH30) az utóbél proximális területét p75, N-cadherin és L1CAM expressziót mutató ENCC-k kolonizálják (16. ábra).



**15. ábra:** A velőcső vagus régiójának transzplantációjával létrehozott kimérák kirajzolják a vándorló ganglionléc-eredetű sejtek helyzetét. **A.)** 6.5 napos embryo (HH29) béltraktusában a zöld fluoreszcens-pozitív (GFP+) ganglionléc-eredetű sejtek a coecum területén lokalizálódnak. **B, C.)** E7 stádiumban (HH30) a legelől haladó GFP+ ENCC-k teljes-szöveti (B) és a hosszanti metszeten (C) vizsgálva az utóbél középső szakaszának kolonizációját mutatják. **D, E.)** A HNK-1 kirajzolja a vándorló sejteket (E, a D ábra bekeretezett területének kinagyítása), amit az összes legelől haladó GFP+ ENCC HNK-1 (E) kettős pozitívítása is igazol. **F.)** E8 (HH32) hosszszelvények GFP expressziója alapján az ENCC-k erre a stádiumra már elérték a cloaca magasságát (nyílhegyek a submucosalis ENCC-ket mutatják). **G, H.)** A HNK-1 ko-expresszió alapján (H, a G ábra bekeretezett területe kinagyítva) a HNK-1 ebben a stádiumban az összes GFP+ ENCC-t jelöli. **G.)** A sacralis ganglionléc-eredetű HNK1+/GFP negatív ENCC-k a plexus pelvicut és a Remak-gangliont hozzák létre. A legelől vándorló ENCC-k N-cadherint (**I**) és p75-öt (**J**) is expresszálnak. Mindegyik ábrán a proximális béltraktus található a kép bal oldalán. cl, cloaca; cr, utóbél; cr ep, utóbél epitheliuma; NoR, Remak-ganglion, pp, plexus pelvicus, smp, plexus submucosus.

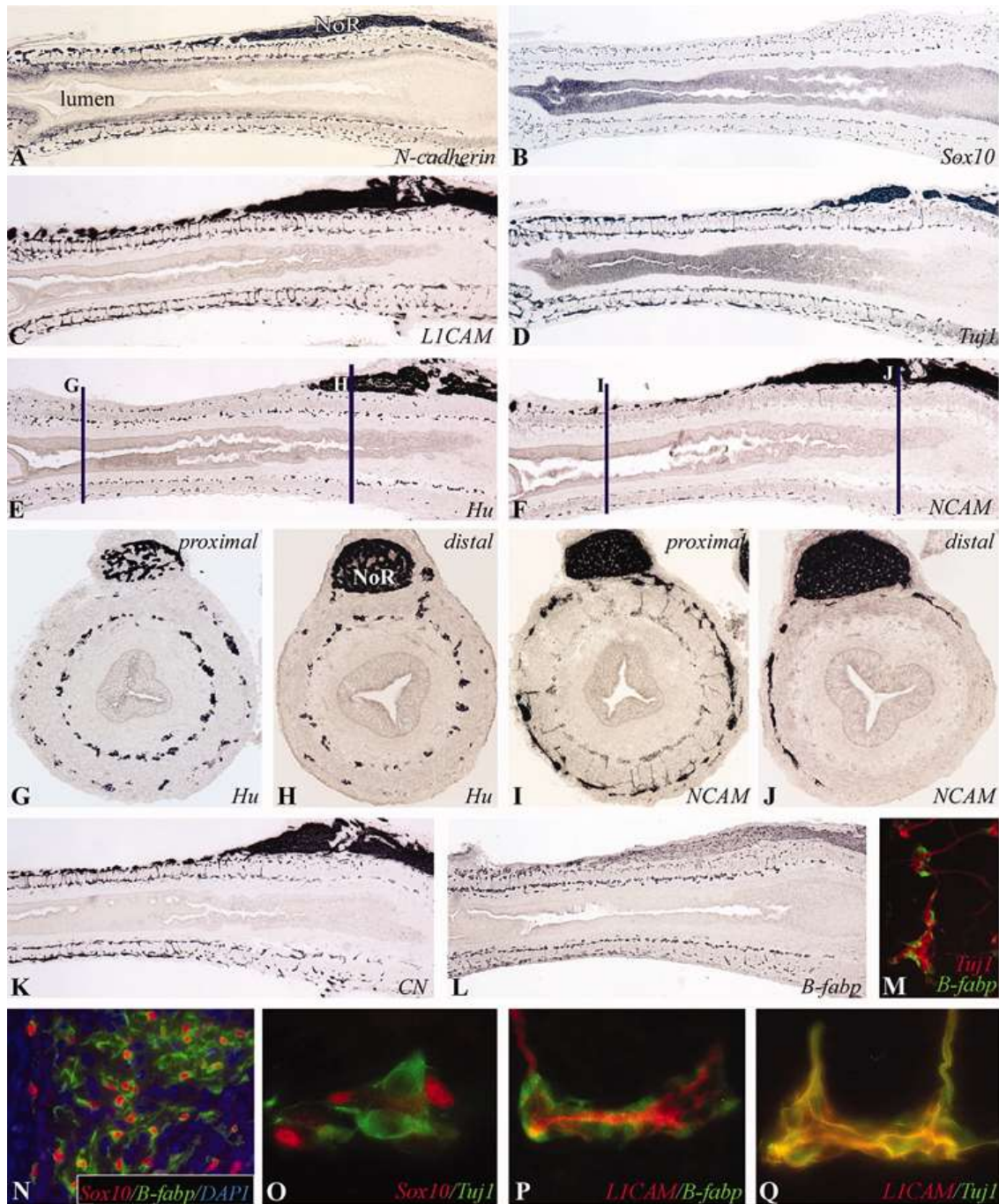
A különböző kombinációkban elvégzett kettős immunhisztokémiai jelölésével először tudtuk igazolni, hogy a vándorló ENCC-k ugyanazon populációja a korábban leírt HNK-1 mellett, kifejezik a p75, SOX10, N-cadherin és L1CAM molekulákat is (16. ábra). Miközben a vándorló ENCC-k legelső csoportja az utóbél felénél jár, a proximális területen megkezdődik a sejtek neuron (16. ábra, I) és glia (16. ábra, J) irányú differenciálódása.



**16. ábra: Az utóbél ENCC kolonizációja 7 napos embrióban. A, C, F.)** A hosszanti sorozatmetszetek p75 (A), N-cadherin (C) és L1CAM (F) festése kirajolja az utóbél középső szakaszán járó (nyilak) enterális ganglionléc-eredetű sejteket (ENCC). **B, D, E, H.)** p75 és SOX10 (B) valamint N-cadherin (D), HNK-1 (E) és L1CAM (H) kettős jelölés igazolja, hogy az ellenanyagok mindegyike jelöli a legelől haladó sejteket. **G.)** A legelől vándorló ENCC-k SOX10-et és a HNK-1-et fejeznek ki. A neuron (I) és glia (J) irányú differenciálódás csak elvétve, a proximális vastagbél területén figyelhető meg (nyilak). Nyílhegy (I) mutatja a differenciálódó HuC/D pozitív neuronok legelső csoportját (a bekeretezett területen nagyítva látható). ep, epithelium; NoR, Remak-ganglion.

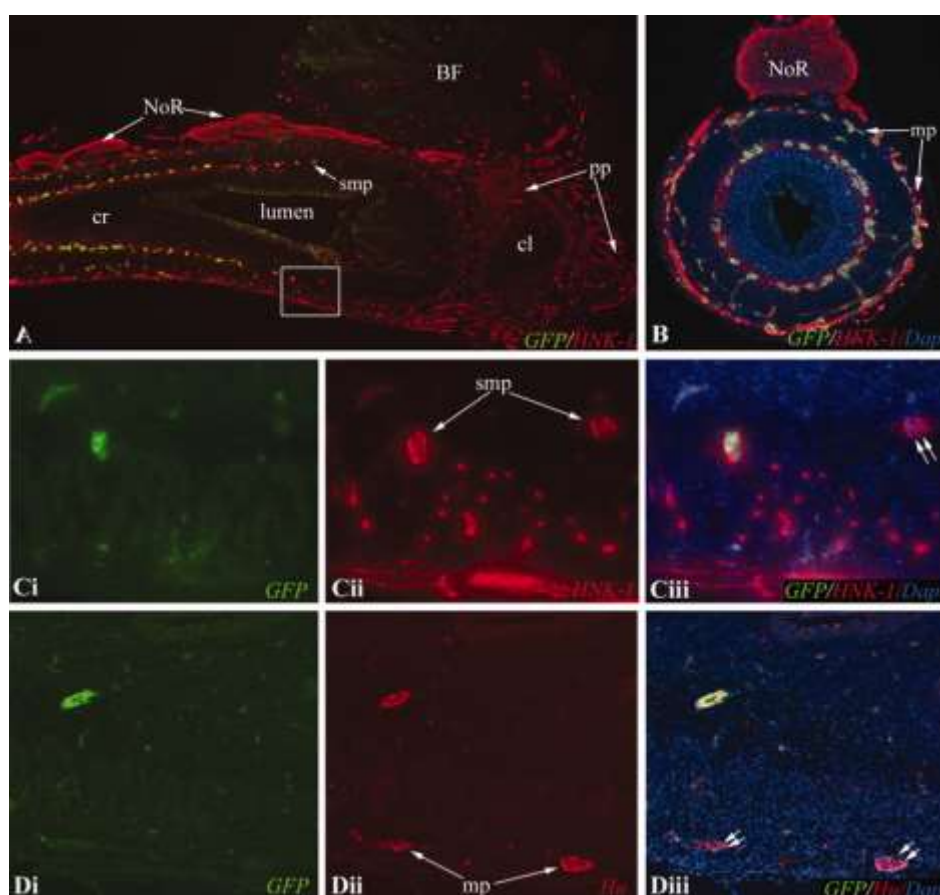


A korai neuronok HuC/D (ELAV neuron specifikus RNS kötő fehérje) molekulát fejeznek ki, a korai glia sejteket B-fabp (brain-fatty acid binding protein) expresszió jellemzi. A utóbél kolonizációja a 8. embryonális napra (HH32) fejeződik be, a submucosalis és myentericus plexus egyaránt kialakul, amit az N-cadherin, SOX10 és L1CAM immunreaktivitás igazol (17. ábra, A-C). A neuronális differenciációt az utóbél teljes hosszában megfigyelhető Tuj1 (III-as típusú beta-tubulin; 17. ábra, D) és CN (csirke neuron specifikus marker; 17. ábra, K) immunreakció igazolja. A HuC/D (17. ábra, E) szintén expresszálódik a teljes utóbél területét benépesítő neuronokban (17. ábra, E,G,H). Az enterális neuronok későbbi markere, az idegi sejtadhéziós molekula (NCAM) expressziója ebben a stádiumban az utóbél proximális szakaszára korlátozódik (17. ábra, F, I), distalisabban mindössze a Remak-ganglionból származó rostok jelölődnek (17. ábra, J). Egy másik neuron differenciációs marker, a neurofilamentum expresszió azonban csak később jelenik meg, az utóbél falában nincs immunreaktivitás, egyedül a Remak-ganglionból kilépő rostok mutatnak neurofilamentum expressziót. E7 (HH30) és E8 (HH32) között a glia differenciálódás ugyancsak előrehalad: időbeli mintázata az enterális neuronoknál megfigyelt differenciálódáshoz hasonló. Míg a E7 stádiumban (HH30; 17. ábra, J) a B-fabp expresszió az utóbél proximális szakaszára korlátozódik (16. ábra, J), addig E8 stádiumban (HH32; 17. ábra, L) az utóbél teljes hosszában kimutatható. A B-fabp és HuC/D, illetve Tuj1 kettős festés igazolja a B-fabp gliasejt specificitását, valamint a B-fabp expressziójának hiányát az enterális neuronokon (17. ábra, M). A SOX10 kezdetben az összes ENCC-et jelöli; a 9. embryonális naptól (HH35) kezdve azonban csak a glia irányban elkötelezett sejtekben található meg (17. ábra, N), az enterális neuronokban nem expresszálódik tovább (17. ábra, O). Ezzel ellentétben L1CAM expresszió az enterális glia sejteken fokozatosan lecsökken (17. ábra, P) és csak az enterális neuronok felszínén marad meg (17. ábra, Q). A GFAP-t (glial fibrillary acidic protein) felismerő ellenanyagot használtunk a differenciált glia kimutatására. E8 (HH32) stádiumban a GFAP csak az utóbél környezetében található Remak-ganglionból származó rostokban expresszálódik (nem mutatott adat), a submucosalis, illetve a myentericus plexus ganglionjai csak a 10. embryonális nap után kezdik kifejezni (HH36; 19. ábra, H).



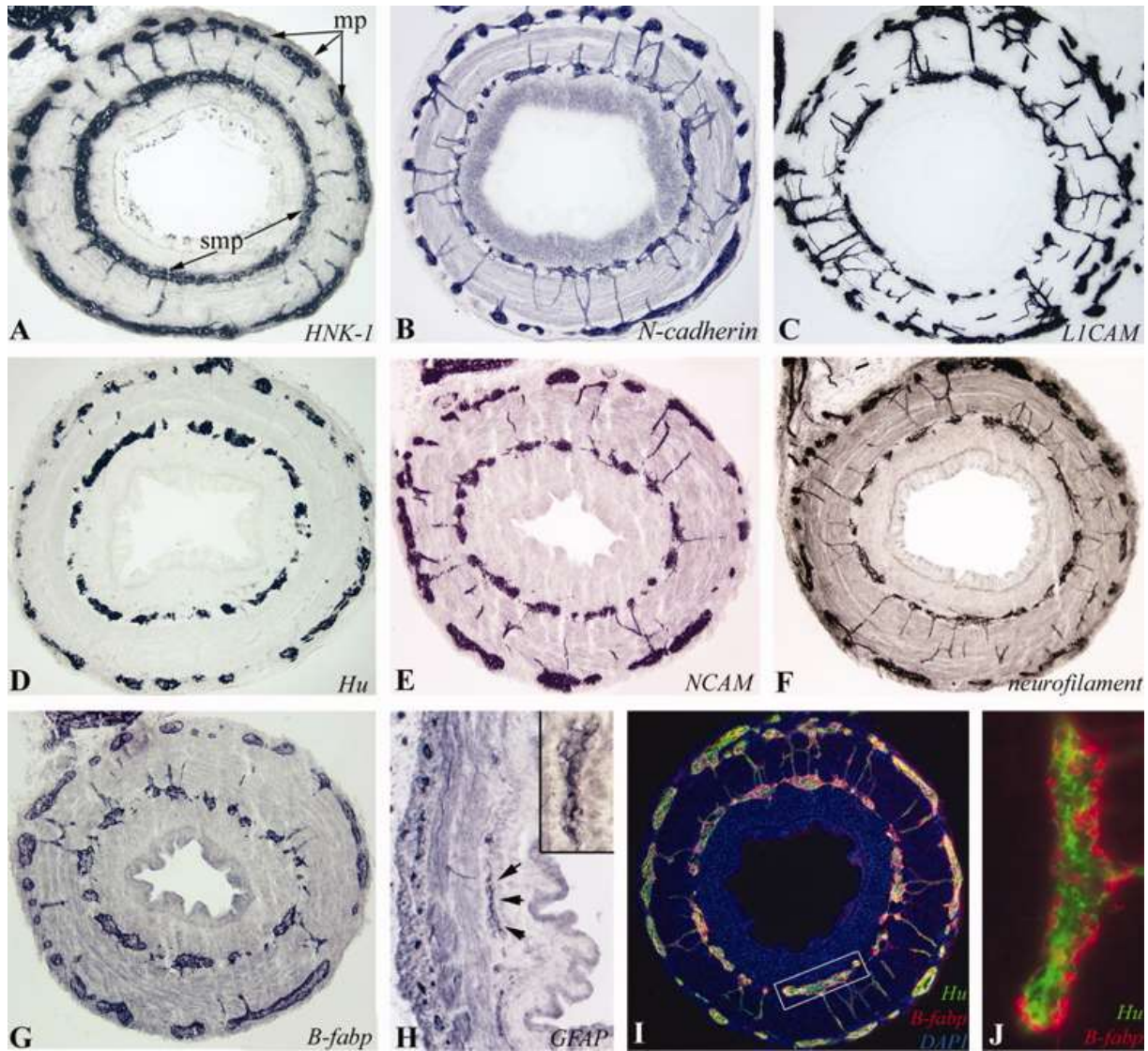
**17. ábra: A 8. embryonális napra (HH32) az utóbél kolonizációja befejeződik. A-C:** E8 (HH32) hosszanti sorozatmetszeteken az N-cadherin (A), SOX10 (B) és L1CAM (C) immunreaktív enterális ganglionléc-eredetű sejtek (ENCC) két plexus mentén történő elrendeződése a teljes utóbél mentén megfigyelhető. **D, E:** A korai neuronális differenciációt Tuj1 (D) és HuC/D (E) festődés igazolja. **G, H:** Amint az a proximális (G) és distális (H) keresztmetszeti képeken (az E ábrán jelölt magasságokból) is látható, a submucosalis plexus sejteinek differenciációja előrehaladottabb, mint a myentericus plexust alkotó sejteké. **F, I, J:** A neuronális differenciáció későbbi markere az idegi sejtadhéziós molekula (NCAM) (F), melyet ebben a stádiumban a utóbél proximális szakaszának (I) enterális neuronjai már expresszálnak, ugyanakkor a distális terület (J) negatív. **K, L:** A szintén neuron marker CN expressziója (K), csak úgy, mint a glia sejteket és prekurzorait jelölő B-fabp expressziója is (L) a utóbél teljes területén megfigyelhető. **M:** A B-fabp-t a glia sejtek expresszálják, a neuronok nem. **N-Q:** E9 (HH35) stádiumtól kezdve a SOX10-et csak a glia sejtek termelik, ami megfigyelhető a Remak-ganglion területén is (N), míg az enterális neuronok a továbbiakban már nem expresszálják (O). Az L1CAM a glia sejtekben lecseng (P) és csak a neuronok expresszálják (Q).

A E10 (HH36) utóbél vagus és sacralis régióból származó ganglionléc sejteket is tartalmaz. Ebben a fejlődési stádiumban GFP+ vagus régióból származó ENCC-k az utóbél teljes hosszában megjelennek (18. ábra, A). A distalis utóbél egyaránt tartalmaz vagus ganglionléc-eredetű (GFP+/ HNK-1+) és sacralis ganglionléc-eredetű (GFP-/HNK-1+) ENCC-eket (18. ábra C, D), demonstrálva ezzel az utóbél idegrendszerének kettős eredetét. E14 stádiumban (HH40; 19. ábra) az összes ENCC továbbra is intenzív és specifikus HNK-1, valamint N-cadherin immunfestődést mutat. Az enterális neuronokra L1CAM, HuC/D, NCAM és neurofilamentum expresszió jellemző, míg a glia sejtek B-fabp-t és GFAP-t expresszálnak (19. ábra).



**18. ábra: A E10 embryo (HH36) utóbél vagus és sacralis velőcsőből származó ganglionléc-eredetű sejteket is tartalmaz. A, B.)** HNK-1 immunreaktivitás jelöli a E10 embryo (HH36) utóbélben található ganglionléc-eredetű sejteket. Ebben a stádiumban a GFP+ vagus régióból kilépő ganglionléc sejtek már a teljes utóbél területét kolonizálták. A Remak-ganglion és a plexus pelvici területén nincs GFP-t expresszáló sejt. **C, D.)** Az A ábra bekeretezett területe a C ábrán látható kinagyítva, illetve a D ábra ezen terület sorozatmetszeti folytatása. GFP és HNK-1 kettős immunfluoreszcens festéssel a submucosalis plexus területén HNK-1+/GFP+ és HNK-1+/GFP- ENCC-k egyaránt megfigyelhetők **(Ci-iii)**. A plexus myentericusban HU+/GFP- enterális neuronok láthatóak **(Di-iii)**. Kettős nyíl jelöli a ganglionléc sacralis területéről származó GFP- ENCC-eket. BF, bursa Fabricii; cl, cloaca; cr, utóbél; mp, plexus myentericus; NoR, Remak-ganglion; pp, plexus pelvici; smp, plexus submucosus.



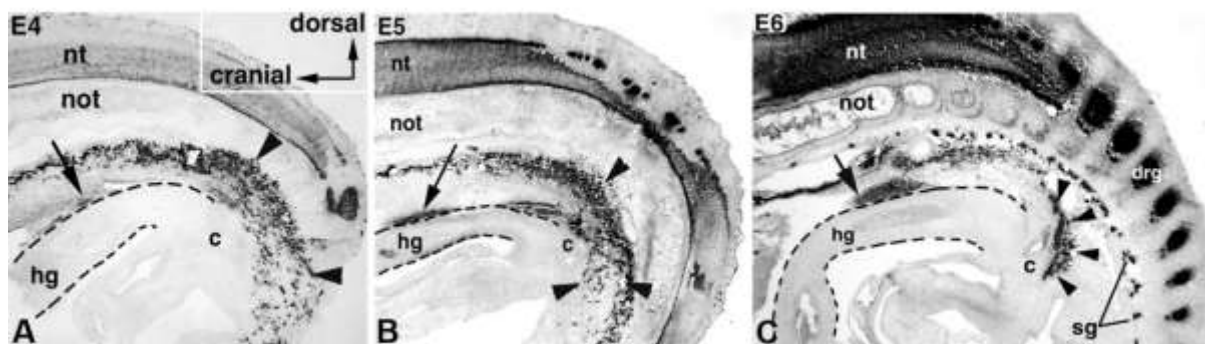


**19. Ábra: E14 (HH38-40) embryo bélidegrendszere komplex neurális hálózatot mutat.**  
**A-C:** E14 (HH40) embryo utóbelének középső szakaszából készített keresztmetszetek HNK-1 (A), N-cadherin (B) és L1CAM (C) immunhisztokémiai jelölése. **D-H:** A differenciálódott ENCC-k HuC/D neuron markert (D), NCAM-ot (E) és neurofilamentumot (F), továbbá B-fabp glia markert (G) és GFAP-t (H) expresszálnak. H: A bekeretezett területen a nyíllal jelölt submucosalis ganglion látható kinagyítva. **I, J:** A neuronok (HuC/D) és glia sejtek (B-fabp) közötti kapcsolat jól megfigyelhető (J, az I ábrán bekeretezett terület kinagyítva), glia sejtek körbeveszik a neuronok csoportját.

#### **4.2. A sacralis velőcsőből származó ganglionléc-eredetű sejtek vándorlása és differenciálódása a vastagbél idegrendszerének fejlődése során.**

Csirke-fürj velőcsőkimérák és korai embryok fluoreszcens carbocianin jelölése kimutatta, hogy a velőcső 28. szomitájától caudálisan fekvő (33-39. szomita szint) szakaszból kilépő ganglionléc-eredetű sejtek az utóbél distalis területeit népesítik be. Egér és csirke embryokon végzett megfigyelések egymással ellentmondó kolonizációs mintázatot írtak le az utóbél sacralis ganglionléc kolonizációjára. Felvetődött, hogy egér embryóban a sacralis ganglionléc sejtek először a plexus pelvicius ganglionjait hozzák létre, ahol több napig tartózkodnak, majd a sejtek egy alpopulációja az utóbél mesenchymájába kerül (Kapur, 2000b; Anderson és mtsai., 2006b). A madárembryóban felvetődött annak a lehetősége, hogy a sacralis ganglionléc sejtek az utóbél dorsalis mesenteriumába vándorolnak, ahol a Remak-gangliont képezik, majd folytatják útjukat és a kinyúló axonok mentén belépnek a bélfal mesenchymájába. Ez a folyamat egybeesik azzal a folyamattal, amikor a vagus régióból származó ENCC-k eljutnak a distalis utóbélbe (Burns és Le Douarin, 1998). A sacralis ganglion-eredetű sejtek madárembryokban is részt vesznek a plexus pelvicius képzésében (Yntema és Hammond, 1954; Catala és mtsai., 1995), de kísérletesen nem bizonyított, hogy a plexus pelviciusból vagy a Remak-ganglionból származó sejtek hogyan vesznek részt az utóbél idegrendszerének kialakulásában.

A madarak sacralis ganglionlécéből származó képleteinek ontogenetikai vizsgálata során a különböző fejlődéstani stádiumú fürj embryok median-sagittális metszeteit először a ganglionléc-eredetű sejteket jelölő HNK-1 antitesttel festettük meg. 4E stádiumban (HH23) a ganglionléc-eredetű sejtek az utóbéltől és a cloacától dorsalis helyzetben, az embryo teljes hosszában nagy számban megtalálhatók (20. ábra, A). Az utóbél mesentériumának dorsalis részén ekkor veszi kezdetét a Remak-ganglion fejlődése. 24-48 órával később megkezdődik a ganglionléc-eredetű sejtek cloaca körüli aggregálódása, amely során a cloacától dorsalis, caudalis és ventrális irányba terjedve, sűrűn rendezett ganglionokból álló plexus pelvicius jön létre, s ami a Remak-ganglion caudalis végének folytatásként jelenik meg (20. ábra, B, C).



**20. ábra: A plexus pelvicus és a Remak-ganglion korai fejlődése. A.)** A HNK-1 ellenanyaggal festett fürjembryo median-sagittális metszete a ventrálisan vándorló sacralis velőcsőből származó ganglionléc-eredetű sejteket mutatja (nyílhegyek). **B.)** Az E5 embryo farokbimbó sagittális metszete HNK-1+ sejteket mutat a Remak-ganglionban (nyíl) és a fejlődő plexus pelvicus területén (nyílhegyek). **C.)** Az E6 stádiumban a HNK-1+ sejtek a cloaca mellett aggregálódtak, és a plexus pelvicust képezik (nyílhegyek). A Remak-gangliont nyíl jelöli. cl, cloaca; drg, érző ganglion; hg, utóbél; nt, velőcső; not, gerinchúr; sg, sympathicus ganglion.

Hasonlóan a csirke embryohoz, 5 napos (HH26) fürj embryóban is a korai neuron markerrel (HuC/D) végzett immunfestés rajzolja ki a posztumblikális középbél magasságában vándorló sejteket, amelyek a 6. embryonális napon (HH28) érik el a coecumot, a 7. napon pedig belépnek az utóbél területére. Az utóbél submucosalis plexusának enterális ganglionléc-sejtek általi kolonizálása a myentericus plexust megelőzve történik.

E8 stádiumra (HH32) az enterális ganglionléc-eredetű sejtek vándorlása a fürj embryo utóbelében majdnem teljesen befejeződik, így az utóbelben egészen a cloaca magasságáig húzódoan megtalálható a ganglionléc-eredetű neuronok és gliasejtek hálózatából álló két koncentrikus plexus (21. ábra, A-D). Ebben a stádiumban a neurofilamentum expresszió már markánsan jelen van, kirajzolja a plexus submucosus és myentericus területén, valamint a kettő között húzódo idegrostokat (21. ábra, C). A HuC/D-val végzett teljes szervi immunfestés során láthatóvá válnak az utóbelben, valamint a cloaca-t körülvevő plexus pelvicus területén található ganglion sejtek (21. ábra, E). A plexus pelvicus jobb anatómiai vizualizációja érdekében ebből a stádiumból a farokbimbó szintjén sagittális- (21. ábra, F), illetve sorozat-keresztmetszeteket készítettünk (21. ábra, G-I). A képek alapján, a plexus pelvicus páros struktúrának tűnik, ami bár a közép-sagittális síkban nem egyértelmű (21. ábra, F), a cloaca-tól dorsalis és ventrális irányban tisztán kivehető képlet (21. ábra, G-I). 9 napos embryo (HH35) distalis utóbelének és cloaca régiójának immunfestése egyértelműen kirajzolja a plexus pelvicus páros struktúráját (21. ábra, J, K). A distalis utóbél és a cloaca

sagittális síkjától kissé lateralisan végzett para-sagittális metszetén a plexus pelvicus kifejezett neuronális hálózata és a Remak-ganglionnal való szoros összeköttetése is megfigyelhető (21. ábra, L). E12 (HH38) stádiumban a Remak-ganglion számos idegrostot küld az utóbélbe (21. ábra, M), míg caudálisabban a plexus pelvicus kialakulása figyelhető meg, mint az ureterek és a cloaca körüli jól fejlett ganglionált plexus (21. ábra, N).

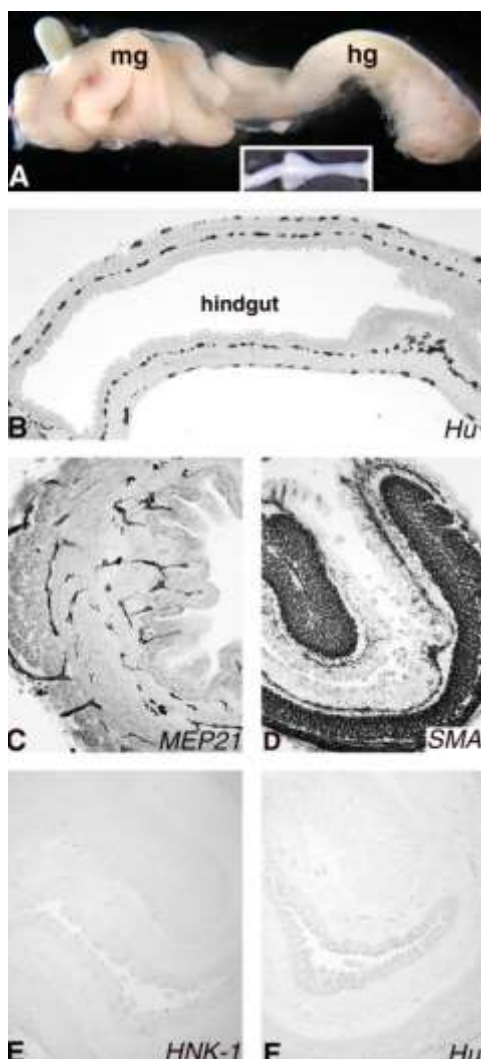


**21. ábra: A plexus pelvicus kialakulása. A-D.)** E8 embryo hosszmetsetein látható a ganglionléce-eredetű sejtek által létrehozott, utóbél teljes hosszában megfigyelhető HNK-1+ (A), HuC/D+ (B), neurofilamentum+ (C) és B-fabp+ (D) sejteket tartalmazó két plexus. **E.)** HuC/D ellenanyaggal végzett teljes-szervi immunfestés a cloaca körüli plexus pelvicus és a Remak-ganglion distalis szakaszának viszonyát mutatja (nyíl). **F-I:** E8 embryóból, az F ábra szerint, a farokbimbó magasságában vezetett keresztmetseteken a plexus pelvicus (G-I, nyílhegyek) cloaca körüli helyzete látható. **J, K.)** E9 utóbél dorsalis (J) és ventrális (K) felszínén a plexus pelvicus (nyílhegy) cloaca körüli helyzete, illetve HuC/D+ neuronjainak Remak-ganglionnal alkotott kapcsolata figyelhető meg. **L.)** E9 embryo para-sagittális metsetein a HNK-1 immunfestés kirajzolja a sűrű ideghálózatot. **M, N.)** E12 embryo HNK-1-el végzett teljes-szervi immunfestésével számos, a Remak-gangliontól az utóbél (M) felé futó idegrost ábrázolódik, caudálisabban a cloaca és az ureter körül (N) pedig gazdag ganglionhálózat figyelhető meg. c, cloaca; ep, epithelium; hg, utóbél; NoR, Remak-ganglion; not, gerinchúr



#### 4.2.1. A Remak-ganglion részvétele az utóbél bélidegrendszerének fejlődésében.

A Remak-ganglion és a plexus pelvicus utóbél idegrendszerének fejlődésében betöltött szerepét szöveti rekombinációs kísérletekkel vizsgáltuk. Amikor első lépésként az E5 ürjembryóból kiperarált utóbelet középbél és coecum szakaszokkal együtt izoláltuk és 9 napig chorioallantois membránon (CAM) tenyésztettük, a bélgraft szignifikáns méretbeli növekedését figyeltük meg (22. ábra, A). Az E5 embryóból izolált bélben a 9 nap CAM tenyésztés során, a kezdetben még csak a postumblicalis középbél területén járó ENCC-k folytatják vándorlásukat és a teljes utóbelet kolonizálják (22. ábra, B). Ezzel szemben, ha a középbél, Remak-ganglion és cloaca nélkül preparáltuk ki az E5 utóbelet és 9 napig CAM-on tenyésztettük, akkor is jól fejlett és vaszkularizált graftok jönnek létre (a MEP21 ellenanyag a ürj graftokat vaszkularizáló, csirke eredetű CAM-ból származó ereket jelöli; 22. ábra, C), a graft simaizom rétegei is normál fejlődést mutatnak (22. ábra, D), azonban ganglion sejtek nincsenek jelen (22. ábra, E, F).



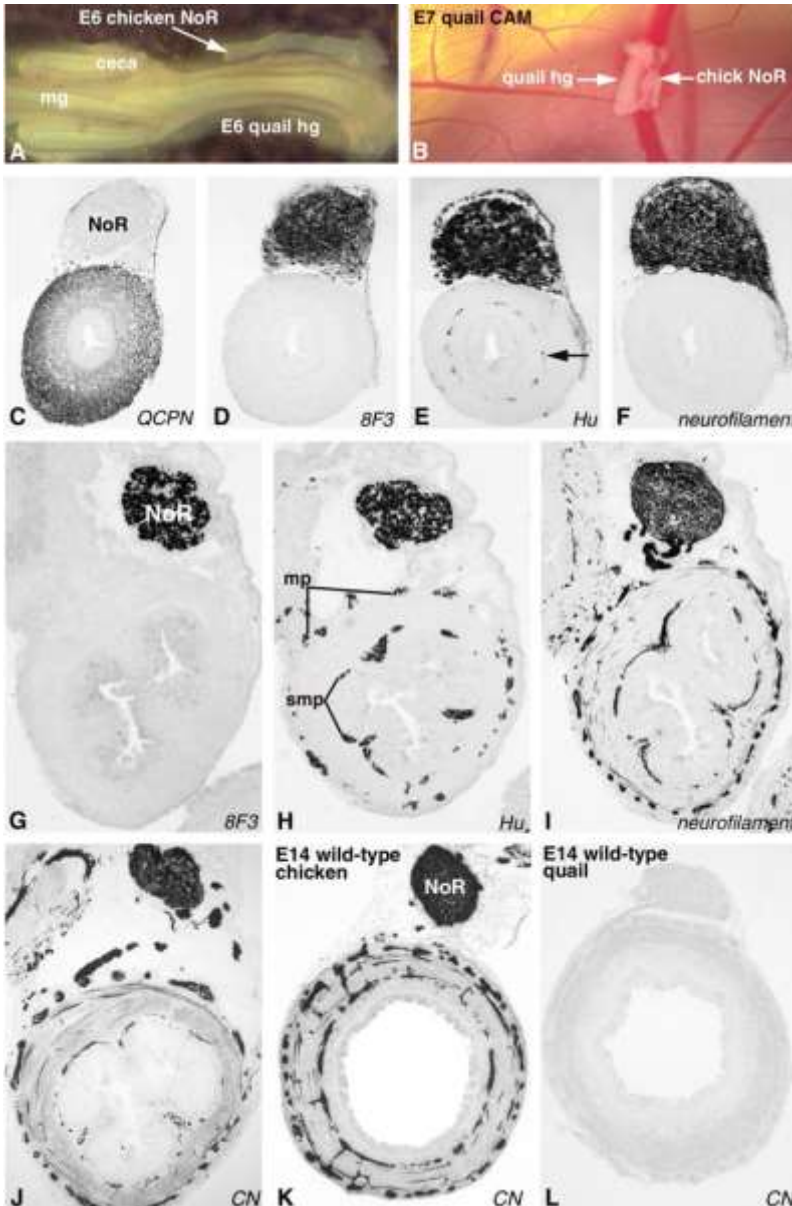
**22. ábra: Gangliont tartalmazó, illetve ganglionmentes utóbél létrehozása chorioallantois membrán transzplantáció (CAM) módszerével. A.) 5 napos ürjembryo kiperarált béltraktusát 9 napig CAM-on tenyésztettük. Az *ex vivo* tenyésztés során jelentős méretbeli növekedés következett be, mely a középbél hosszát kifejezetten érintette. A.) A tenyésztett graft méret az eredetihez (A, bekeretezett rész) viszonyítva; a két nagyítás mértéke megegyezik. B.) HU immunfestés alapján a CAM tenyésztés ideje alatt, a vaguseredetű ganglionléc sejtek az utóbél teljes egészét kolonizálják. C-F.) A középbél, Remak-ganglion (NoR) és a cloaca nélkül kiperarált, preganglionotikus E5 utóbél 9 nap CAM tenyésztését követően normál érhálózat (C) és simaizom differenciálódás (D) figyelhető meg, viszont ganglionléc-eredetű sejt a graft területén nem azonosítható (E, F). hg, utóbél; mg, középbél; SMA, alpha-simaizom aktin.**



A következő embryomanipulációs kísérletben a Remak-ganglionnak a bélidegrendszer fejlődésében való részvételét vizsgáltuk. Az E5 fürj embryoból izolált, Remak-gangliont tartalmazó utóbél szakaszt 9 napig CAM-on tenyésztettük. Annak érdekében, hogy a sacralis ganglionléc-eredetű sejtek más területekről történő bevándorlását megakadályozzuk, a transzplantációt megelőzően a cloacát együtt a plexus pelvicius-al eltávolítottuk. A CAM transzplantációt követően az utóbelet HuC/D és B-fabp ellenanyagokkal festettük meg. A bélfal területén neuron és glia sejteket nem találtunk, azonban helyenként intenzív neurofilamentum festődés mégis megfigyelhető volt (képekkel nem mutatott adat).

A Remak-ganglionból származó sejtek utóbélbe lépésének elmaradása felveti annak a lehetőségét, hogy a kolonizációhoz a vagus eredetű ENCC-k jelenléte is szükséges. Ezt a lehetőséget csirke-fürj szöveti rekombinációnak CAM tenyésztés technikával történő kombinációjával vizsgáltuk. A közép és utóbelet tartalmazó bélszakaszt E6 fürj embryoból preparáltuk ki, ekkor a vagus régióból származó ENCC-k a coecum magasságában járnak. A Remak-ganglion és a cloaca eltávolítását követően a fürj utóbélszakaszt E6 csirke eredetű Remak-ganglionnal rekombináltuk (23. ábra, A). A rekombinált szövetet 1 napig 3D-kollagén szervtenyészetben tartottuk, amely lehetővé tette a szövetek összetapadását. Ezt követően eltávolítottuk a középsőbelet és a coecumot, majd a Remak-gangliont tartalmazó csirke utóbelet E7 fürj embryo CAM-ra ültettük (23. ábra, B). Az átültetés előtt végzett sorozatmetszetek QCPN fürj-specifikus ellenanyaggal (23. ábra, C), illetve 8F3 csirke-specifikus ellenanyaggal végzett immunfestése igazolja az utóbél és a Remak-ganglion fajspecifikus eredetét. Továbbá, kimutatható az utóbél submucosalis plexusának HuC/D+ neuron populációja (23. ábra, E). A Remak-ganglion területén a HuC/D pozitivitás mellett, neurofilamentum immunreaktivitás is látható, ami azonban a bél területén negatív (23. ábra, F). A CAM tenyésztés 7. napján a graftot eltávolítottuk, majd immunhisztokémiát végeztünk. A 8F3+ csirke-eredetű sejtek csak a Remak-ganglion területén figyelhetők meg, intramurálisan a bélben nincsenek jelen (23. ábra, G). Számos HuC/D+ neuron látható a graft területén is (23. ábra, H), de mivel ezek a sejtek nem 8F3+-ak, következésképpen a középsőbél felől caudalisan vándorló fürj-eredetű ENCC-től származnak. A neurofilamentum expresszió mind a Remak-ganglion, mind a bélfal területén megfigyelhető (23. ábra, I). Feltételezéseink szerint a kifejezett neuronális festődés a fürj- és csirke-eredetű idegrostok együttes jelenlétének köszönhető. Ezt CN csirke neurit specifikus ellenanyaggal (Tanaka és mtsai., 1990) igazoltuk. A graft területén látható CN+

idegrost (23. ábra, J) igazolja, hogy a csirke Remak-ganglion-ból származó idegrostok a csirke-fürj szöveti rekombináció során képesek a fürj utóbélbe penetrálni. A CN ellenanyag csirke specificitását E14 csirke (23. ábra, K), illetve fürj embryon (23. ábra, L) igazoltuk. Az utóbél+Remak-ganglion transzplantációja, valamint a csirke-fürj rekombináns graft igazolja, hogy a Remak-ganglion az intrinsic bélidegrendszer sejtjeihez nem járul hozzá.



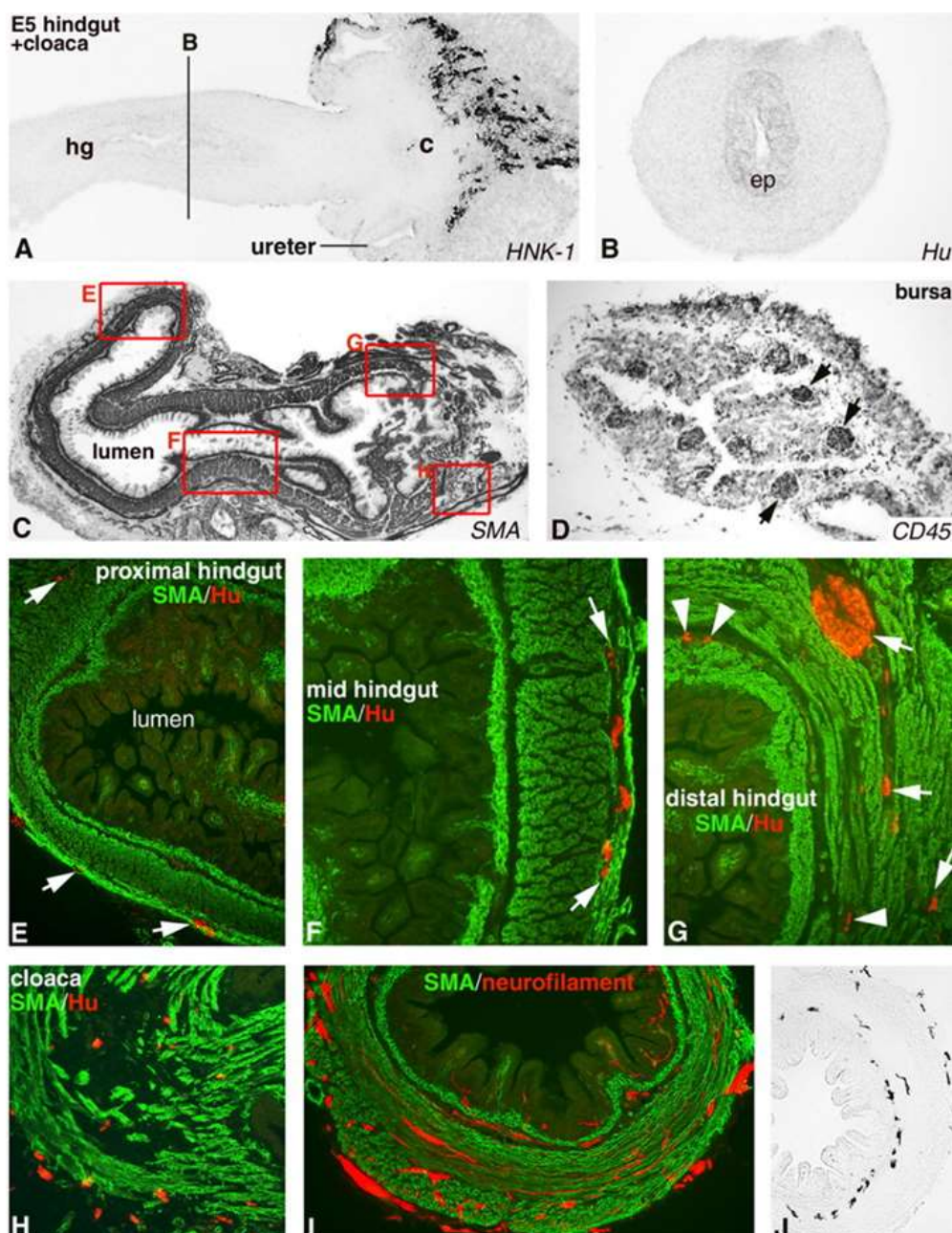
**23. ábra: Csirke-fürj szöveti rekombináció alapján a Remak-ganglion idegrostokkal ugyan hozzájárul, sejtekkel azonban nem vesz részt az utóbél bélidegrendszerének kialakításában. A.)** 6 napos csirke embryo Remak-ganglionját és 6 napos fürj embryo közép- és utóbélét rekombináltuk, majd egy éjszakán át együtt tenyésztettük. **B.)** 24 órával később a coecumot és a középbelet eltávolítottuk, majd a Remak-ganglionnal rekombinált utóbelet fürj chorioallantois membránjára (CAM) transzplantáltuk. **C, D:** A transzplantációt megelőzően készített keresztmetszeteken a QCPN+ fürj utóbél (C) és a 8F3+ csirke Remak-ganglion (D) közeli viszonya látható. **E.)** A graft területén fürj eredetű HU+ neuronok figyelhetők meg (nyíl). **F.)** Neurofilamentum festődés csak a Remak-ganglion területén figyelhető meg. **G, H.)** A rekombináns graftban 7 nap CAM tenyésztését követően 8F3+ sejtek kizárólag a Remak-ganglion területén láthatóak, 8F3 + sejtek a bélben nem jelennek meg (G), viszont számos fürj-eredetű neuron kimutatható a bélfalban (H). **I:** A neurofilamentum festődés a graft teljes területére kiterjed. **J.)** A Remak-ganglionból származó idegrostok azonosítására CN, csirke neurit-specifikus jelölést végeztünk, mely számos csirke Remak-ganglion-eredetű idegrost jelenlétét igazolta a bélfalban. **K, L.)** Az ellenanyag fajspecifitásának igazolása. hg, utóbél; mg, középbelet; mp, myenterális plexus; smp, submucosalis plexus; NoR, Remak-ganglion.

#### 4.2.3. A plexus pelvicus részvétele az utóbél bélidegrendszerének fejlődésében.

Annak meghatározására, hogy a plexus pelvicus hozzájárul az utóbél idegrendszerének neuronális sejtjeihez, E5 ürj embryo utóbelét a cloaca régióval együtt kipreparáltuk és 9 napig CAM-on tenyésztettük. A transzplantációt megelőzően a Remak-gangliont eltávolítottuk. E5 utóbél hosszanti és keresztmetszetének HNK-1 és HuC/D festése kirajzolja a cloaca területére korlátozódó ENCC-ket (24. ábra, A, B). A kilenc napos CAM tenyésztést követően izoláltuk az utóbelet és megvizsgáltuk a ganglionok fejlődését. Alpha-simaizom aktin immunfestés

a cloaca és az utóbél simaizomszövetének differenciálódását mutatja (24. ábra, C). Továbbá a grafthoz kapcsolódó cloaca jelenlétét a bursa Fabricii (primer nyirokszerv) kifejlődése igazolta (24. ábra, D; Nagy és mtsai., 2005). Simaizom aktin és HuC/D ellenanyagokkal végzett kettős immunfluoreszcens festés a HuC/D+ neuronok jelenlétét igazolja, amely a distalis utóbél (24. ábra, G) és a cloaca területét (24. ábra, H) összehasonlítva az utóbél proximális- (24. ábra, E) és a középső (24. ábra, F) szakaszával nagyobb sejtsűrűséget mutat. A neuronok többsége a myentericus régió területére koncentrálódik (24. ábra, E-G, nyíl), a submucosalis rétegben csak elszórtan található néhány HuC/D+ sejt (24. ábra, G, nyílhegyek). A ganglionléc-eredetű sejtek egy része B-fabp+ glia sejtekké differenciálódik (nem mutatott adat). A neuronális perykarionok mellett, a neurofilamentum ellenanyag kiterjedt axonhálózatot rajzol ki a bél falban (24. ábra, I). Érdekes módon az utóbél+cloaca régió számos pigmentsejtet is tartalmaz, ami főként a submucosalis régióra volt jellemző (24. ábra, J).

Az utóbél+cloaca graftból származó adatok azt sugallják, hogy a plexus pelvicus sejtjei az utóbél mentén folytatott craniális irányú vándorlásuk során nagyobb távolság megtételére is képesek. Ezt a megfigyelésünket ürj utóbél+csirke cloaca szöveti rekombinációjával támasztottuk alá, amely lehetővé tette számunkra a plexus pelvicusból származó csirke-eredetű sejtek szelektív elkülönítését a ürj vagus régióból származó ENCC-k által létrehozott ganglionokban. A kísérlet kiemelt jelentőségét adja, hogy a sacralis régióból származó ganglionléc sejtek normál esetben a vagus-eredetű ganglionléc sejtek megérkezéséig nem járulnak hozzá az utóbél idegrendszerének kialakulásához (Burns és Le Douarin, 1998). Az embryomanipulációs kísérlet során Remak-gangliontól izolált E6 ürj utóbelét 6 napos csirke embryo cloacájával rekombináltuk (a szöveti adherencia biztosítása érdekében a graftokat egy éjszakán át 3D-kollagén gélben tenyésztettük).

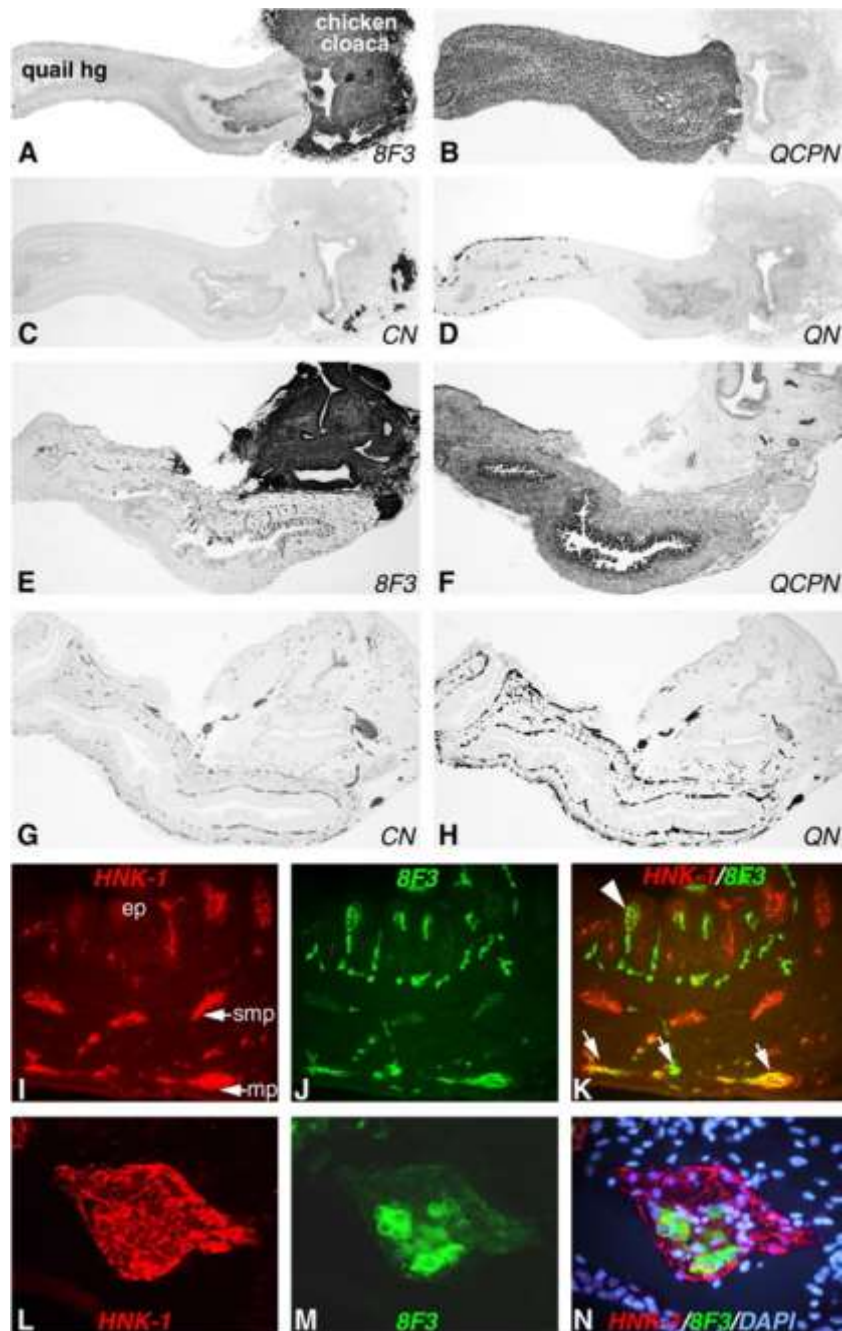


**24. ábra:** A plexus pelvicus eredetű ganglionléc sejtek hozzájárulnak az utóbél idegrendszerének fejlődéséhez. E5 fürj embryo utóbélét Remak-ganglion nélkül, cloacaval és az a környező mesenchymával együtt kipreparáltuk. **A.)** Hosszanti metszetek HNK-1 festése kirajzolja a plexus pelvicust. **B.)** Az A ábrán jelölt szintnek megfelelő keresztmetszet HuC/D immunfestése a neuronok hiányát mutatja. **C.)** 9 nap choriallantois membránon (CAM) történő tenyésztést követően, simaizom aktin festéssel a graft muscularis rétegenek megfelelő fejlődése látható. **D.)** A cloaca régiójának normális fejlődését, a bursa Fabricii lymphoid folliculusait (nyíl) jelölő CD45 (csirke specifikus közös leukocyta marker) ellenanyaggal igazoltuk. **E-H.)** 9 nap CAM tenyésztést követően a graft hosszmetsetein végzett simaizom aktin (zöld) és HuC/D (piros) jelölés számos ganglionléc-eredetű neuron jelenlétét igazolta az utóbél területén (metszetek a C ábrán jelölteknek megfelelő területekről készültek). **E-G.)** A HuC/D+ sejtek sűrűsége a myentericus plexus (E-G, nyíl) területén nagyobb, mint a submucosalis plexusban (G, nyílhegy). **I.)** A graft mentén kiterjedt neurofilamentum festődés figyelhető meg. **J.)** Pigment sejtek elszórtan a bélfal mesenchymájában. c, cloaca; ep, epithelium; hg, utóbél.

A rekombináns graft hosszanti metszetének csirke sejtekre specifikus 8F3 (25. ábra, A) és fürj sejtekre specifikus QCPN (25. ábra, B) ellenanyagokkal végzett immunhisztokémiai jelölése egyértelműen igazolja a cloaca és az utóbél fajspecifikus eredetét. Míg a CN csirke neurit-specifikus ellenanyag kirajzolja a cloaca területén található plexus pelvicust (25. ábra, C), addig a QN fürj neurit marker nem mutat pozitívást a cloacában, viszont jelöli az utóbél proximális szakaszán található vagus régióból származó ENCC-kből képződő ganglionokat (25. ábra, D). A 7 napos fürj CAM tenyésztést követően számos 8F3+ (25. ábra, E) sejt figyelhető meg a QCPN+ fürj utóbél területén (25. ábra, F). Csirke-eredetű (8F3+) endothel sejtek jelenléte kivehető a fürj utóbél bélbolyhaiban (25. ábra, E, K, nyílhegy), ami a MEP21 endothel specifikus ellenanyaggal is festődik (nem mutatott adat). Az utóbél területén CN+ (25. ábra, G) és QN+ (25. ábra, H) idegrostok is kimutathatók, demonstrálva a kialakult bélidegrendszer kimérizmusát. Ezek a kísérletek egyértelműen igazolták, hogy a vagus-eredetű ganglionléc sejtek jelenlétében a plexus pelvicus hozzájárul az utóbél ganglionjaihoz, amit a rekombináns grafton HNK-1 és 8F3 kettős immunfluoreszcens festésével is igazoltuk. A fürj graft plexus myentericusának területén 8F3+/HNK-1+ sejteket rendszeresen láthatunk (25. ábra, I-K). Ezek közül néhány ganglion kiméra jellegű, azaz csirke és fürj-eredetű ganglionléc sejteket egyaránt tartalmaz (25. ábra, L-N).

Összefoglalva, **csirke-fürj szöveti rekombinációkkal és embryomanipulációs módszerekkel igazoltuk, hogy a plexus pelvicus ganglionléc-eredetű sejtjei hozzájárulnak az utóbél idegrendszeréhez.**

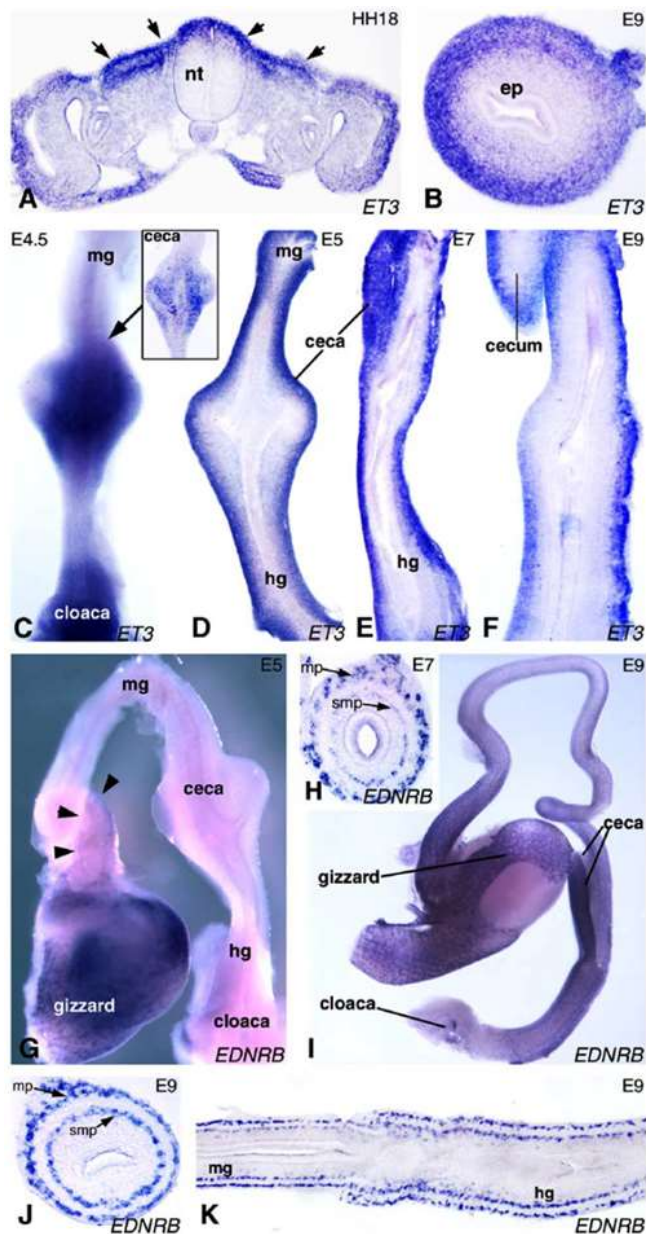




**25. ábra: Csirke-fürj rekombinációs kísérletek igazolják, hogy a plexus pelvicus részt vesz a bélidegrendszer kialakulásában.** E6 fürj embryo utóbélét E6 csirke cloacával rekombináltuk, 24 órán át 3D-kollagén gélben tenyésztettük ezt követően pedig immunhisztokémiával vizsgáltuk. **A, C:** A plexus pelvicut tartalmazó 8F3+ csirke cloacában (A) CN csirke specifikus neurit ellenanyaggal festettük meg (C). **B, D:** A proximális szakaszán vagus velőcsőből származó ganglionléc sejteket tartalmazó QCPN+ fürj utóbelet (B) QN fürj-specifikus neurit markerrel festettük (D). A rekombinált graftokat 7 napig CAM-on tenyésztettük. **E, F:** A 8F3 immunfestés csirke cloaca-eredetű sejteket (E) mutatott a QCPN+ utóbél területén (F). **G, H:** A graft bélidegrendszerében CN+ csirke és QN+ fürj idegrostok egyaránt jelen vannak. **I-K:** HNK-1 (I) és 8F3 (J) kettős immunfluoreszcens jelölés alapján a fürj utóbél néhány ganglionléc-eredetű sejtje csirkéből származik (K, nyíl). A 8F3+/HNK-1- sejtek endothel sejtek (K, nyílhegy). **L-N:** A myentericus ganglion nagyított felvételén csirkéből és fürjből egyaránt származó ganglionléc-eredetű sejtek kimériszmusát látjuk. ep, epithelium; hg, utóbél; mp, myentericus plexus; smp, submucosalis plexus.

### 4.3. Endothelin-3 szerepe a bélidegrendszer fejlődésében

A bélben lévő ENCC-k migrációját, proliferációját, túlélését és differenciálódását elsősorban a bél mesenchymában kifejeződő növekedési faktorok, az Endothelin-3 (EDN3) és a glia-eredetű növekedési faktor (glial-derived neurotrophic factor; GDNF) szabályozzák. Ezeknek a fehérjéknek, valamint az ENCC-ken expresszálandó receptorok (EDNRB, RET) kölcsönhatása szükséges a normális bélidegrendszer kialakulásához.

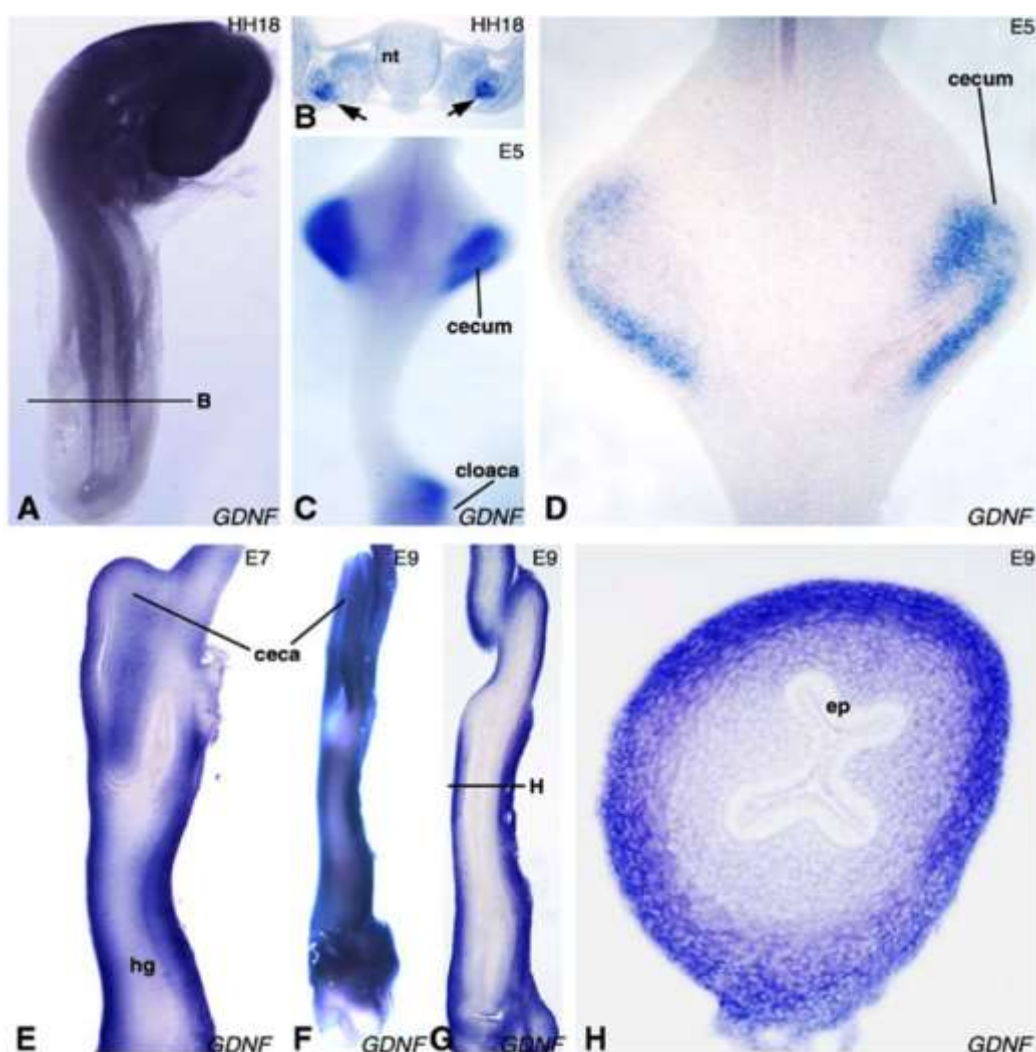


26. ábra: Az *EDN3* és az *EDNRB* expressziós mintázatának változása az utóbél fejlődése során (*in situ* hibridizáció).

Korábban már leírták a madarak béltraktusában az *EDN3* és a *GDNF* expresszióját (Homma és mtsai., 2000; Nataf és mtsai., 1996; Nataf és mtsai., 1998), de a génkifejeződés mintázatának részletes karakterizálása a bélidegrendszer fejlődése során nem volt ismert. HH17-HH35 stádiumú embryokon végzett teljes-szöveti *in situ* hibridizációval vizsgáltuk meg a két növekedés faktor expressziós mintázatát. A HH18 és HH21 (E3) között az *EDN3* mRNS expressziója a melanoblastok vándorlási útvonalával egybeeső szubektodermális mesenchymában fejeződik ki először (26. ábra, A, nyilak). 4.5 napos embryóban az *EDN3* expressziója specifikusan a coecum kezdemény és a cloaca területén látható (26. ábra, C), míg a középbél teljes területén, illetve az utóbél mesenchymájának külső rétegében csak később, az E5 stádiumtól kezdve expresszálandó (26. ábra, B-F). Az *EDNRB* a fejlődő bél ganglionléc-eredetű sejteiben fejeződik ki: E5 stádiumban az

*EDNRB* expressziója a gyomor és a duodenum proximális területére korlátozódik (26. ábra, G). E7 stádiumtól (26. ábra, H) kezdve az *EDNRB* pozitív sejtek az utóbél teljes területén jelen vannak, így a 9 napos embrióban is az utóbél teljes hosszában megfigyelhetők (26. ábra, I-K).

A *GDNF* expressziója a HH18 embrióban a nefrogén mesenchyma területére jellemző (27. ábra, A, B). A bél distalis területének *GDNF* expressziója az E5 stádiumban válik egyértelműen láthatóvá, amikor megjelenik a coecum és a cloaca kezdeményének mesenchymájában (27. ábra, C). A coecum magasságában készített hosszmetseten a *GDNF* expresszió a mesenchyma külső területén lokalizálódik (27. ábra, D), majd a E7 stádiumtól kezdve a *GDNF* a bél teljes hosszában kifejeződik. Expressziója az *EDN3* mintázatához (26. ábra, D-F) hasonlóan a mesenchyma periferiájára korlátozódik (27. ábra, E-H).

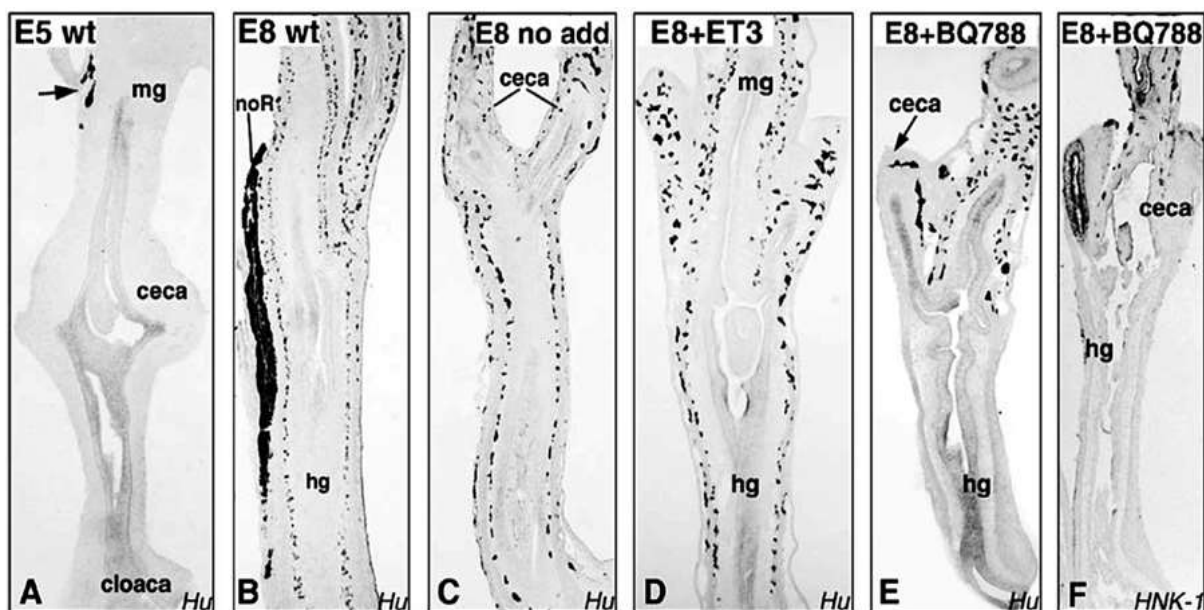


27. ábra: A *GDNF* expressziós mintázatának változása az utóbél fejlődése során (*in situ* hibridizáció).



#### 4.3.1. Az EDNRB jelátvitel elengedhetetlen az utóbél megfelelő kolonizációjához

Annak érdekében, hogy igazoljuk az EDNRB aktivitás szükséges az utóbél kolonizációjához, E5 csirke, illetve fürj bélszakaszokat (közép+utóbél) EDN3, illetve EDNRB antagonistá BQ788 jelenlétében, 72 óráig 3D-kollagén mátrixban tenyésztettük. HuC/D ellenanyaggal a neuronális differenciációt igazoltuk, míg HNK-1-vel a ganglionléc-eredetű sejteket jelöltük. Mint ahogy azt korábban is láttuk, az E5 embryóban a középbél rostralis szakaszán HuC/D+ ENCC-k találhatóak, azonban a középbél caudális szakaszától distalisan, beleértve a teljes utóbelet is, a HuC/D+ sejtek hiányoznak (28. ábra, A). A E8 stádiumban az utóbél distalis területén már megfigyelhetők HuC/D+ sejtek (28. ábra, B). E5 embryonális bél hozzáadott fehérjét nem tartalmazó kontroll médiumban (n=24) történő 72 óra tenyésztése során az utóbél teljes HuC/D+ kolonizációja végbemegy (28. ábra, C). Ugyanezt az eredményt látjuk a tisztított EDN3 jelenlétében tenyésztett bélszakaszokban (28. ábra, D, n=35), azonban a BQ788 jelenlétében végzett tenyésztés esetében (n= 35) a sejtek vándorlása a coecum magasságában megállt, a teljes utóbél ganglionmentes maradt (28. ábra, E). A HNK-1 ellenanyaggal végzett immunfestés (28. ábra, F) megerősíti a HuC/D immunfestéssel kapott eredményeket, alátámasztva ezzel, hogy a jelenség hátterében nem csupán a neuronális differenciáció késése áll, hanem a ganglionléc-eredetű sejtek vándorlásának elakadása is. Ez a kísérlet igazolja, hogy az utóbél ENCC kolonizációjának folyamatában az EDNRB jelátvitel elengedhetetlen szerepet játszik.

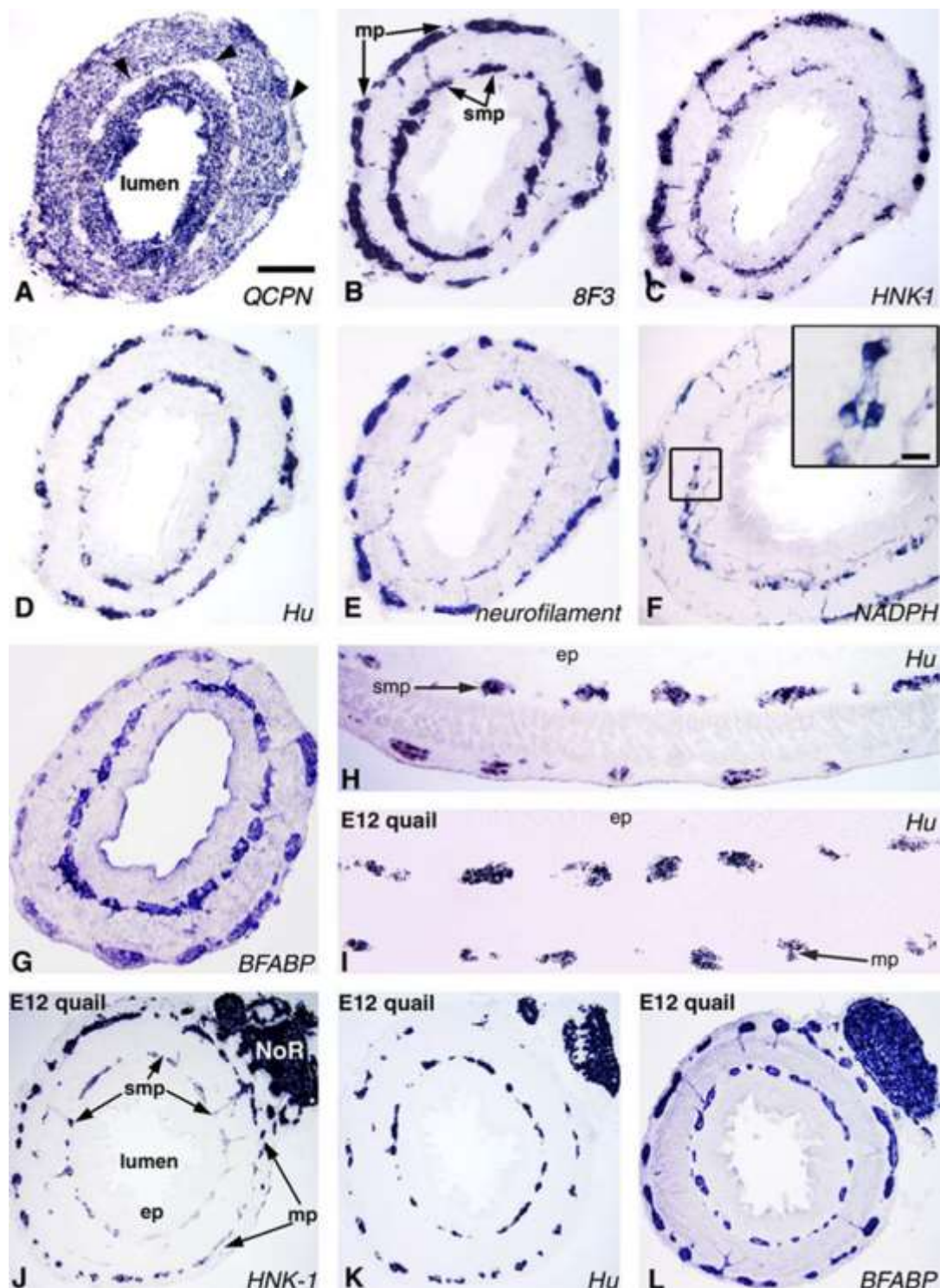


**28. ábra:** Az EDN3-EDNRB jelátvitel elengedhetetlen az utóbél kolonizációjához. **A.)** E5 utóbelet EDN3 rekombináns fehérje vagy BQ788 jelenlétében, 72 órán keresztül kollagén gélben tenyésztettük. A hosszmetseteket HuC/D ellenanyaggal jelöltük. **A-B.)** E5 stádiumban az ENCC-ek csak a középbel proximális területén figyelhetők meg (A, nyíl). E8 stádiumban a HuC/D+ sejtek a bél teljes hosszában megtalálhatók. **C.)** A 72 órán keresztül hozzáadott fehérje nélkül tenyésztett E5 bél a E8 embryoval (B) megegyező fenotípust mutat. **D-F.)** Az EDN3 fehérje jelenlétében nem látható változás az ENCC vándorlásban (D), míg BQ788 jelenlétében a HuC/D+ sejtek migrációja a coecum magasságában megáll és az utóbél ganglionmentes marad. hg, utóbél; mg, középbel; noR, Remak-ganglion.

#### 4.3.2. Embryonális bélkiméra technika, egy új módszer a bélidegrendszer in vivo tanulmányozására.

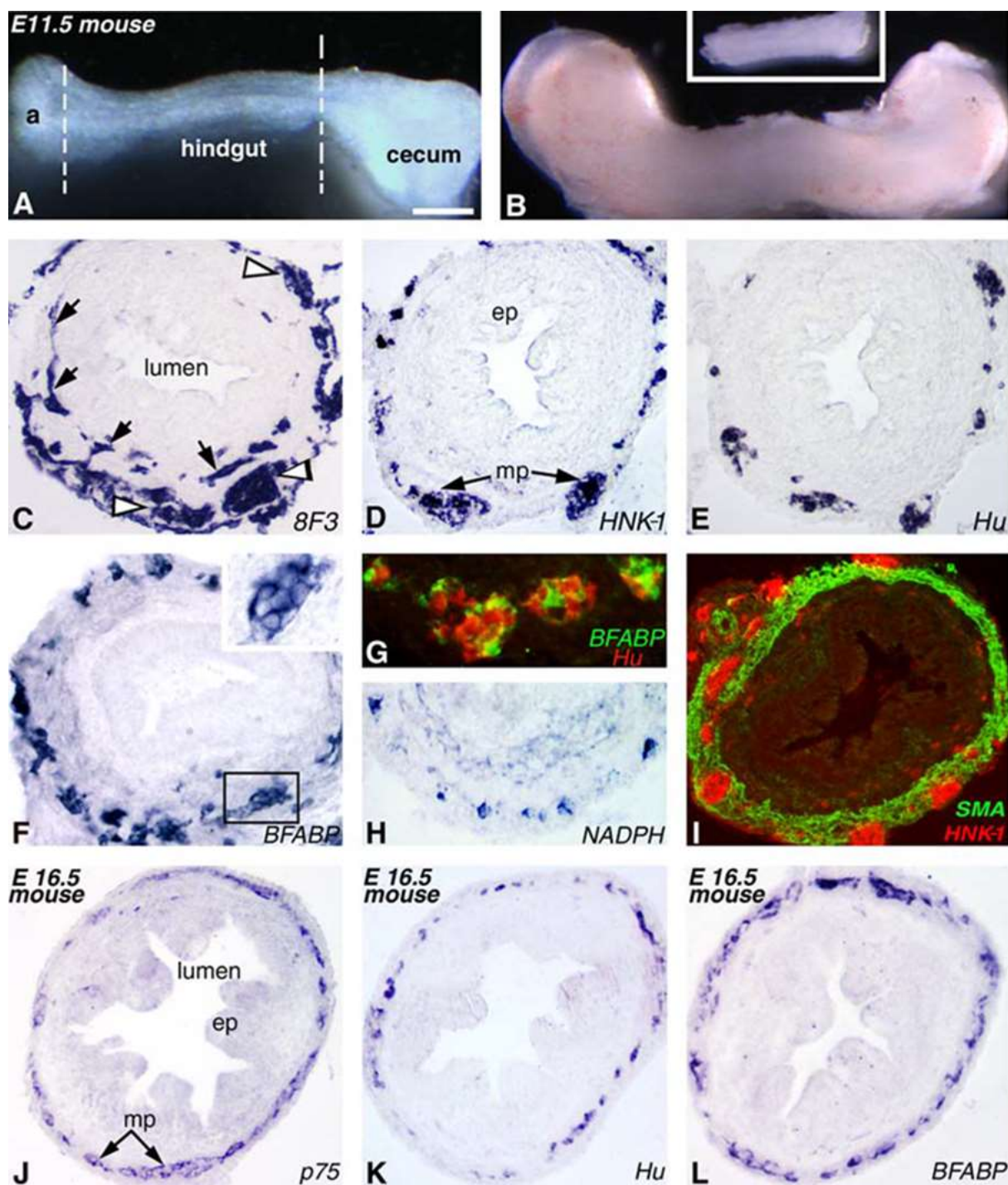
Az EDN3 jelátvitel bélidegrendszer fejlődésében betöltött szerepének vizsgálatára az embryonális testüregbe történő transzplantáció egy új technikáját dolgoztuk ki. E5 ürj embryo, illetve E11.5 egér embryo utóbelének coecum és cloaca közötti szakaszát mikrosebészeti technikával eltávolítottuk és 3 napos fogadó csirke embryo testüregébe transzplantáltuk, majd 7 napig tenyésztettük (n=32). A transzplantáció idején az E5 ürj utóbelet a ganglionléc-eredetű sejtek még nem kolonizálták, ezt igazolja az E5 embryo median-sagittális és az E5 utóbél keresztmetszeti képe. A Remak-gangliont és a plexus pelvicus régióját a transzplantációs kísérletek előtt mindig eltávolítottuk (6. ábra, A-D). A testüregben

történő inkubálás végén, a graft rendszerint a májhoz és a jobb tüdőhöz asszociáltan található. A transzplantált bél immunhisztokémiai analízise során a sejtek eredetét, illetve differenciációs képességét faj-, és sejtspecifikus ellenanyagokkal vizsgáltuk. A csirke eredetű sejteket jelölő 8F3 ellenanyaggal a submucosalis és a plexus myentericus erősen festődött, ami igazolja, hogy ürj utóbelet a fogadó csirke embryoból származó sejtek kolonizálják. A ürj sejtmagot specifikusan jelölő QCPN ellenanyag intenzíven festette a hámot és a bél mesenchymáját, azonban a neurális plexusokat nem jelölte. A sorozatmetszés immunfluoreszcens jelölése alapján a 8F3-immunreaktív sejtek HNK-1-et, neuron specifikus HuC/D-t, neurofilamentumot, NADPH-t és glia-specifikus B-fabp-t is expresszálnak. A kiméra kísérlet alapján elmondható, hogy a ürj, illetve egér utóbél graftot a fogadó csirke embryoból származó ENCC-k kolonizálják, ahol neuron és glia sejteket tartalmazó ganglionok két plexusát hozzák létre (29. Ábra). Egér-csirke bélkimérákat hasonló módon állítottuk elő az E11.5 egér utóbél alkalmazásával (30. Ábra). Ebben a stádiumban a bélben található ENCC-k migrációs frontja éppen elérte az egér coecumát (Druckenbrod és Epstein 2005). 7 napos transzplantációt követően a graftok jelentősen növekedtek, differenciálódtak. Csirke embryoból származó sejtek kolonizálták a graftot; a külső 8F3+ sejtek kettős jelölést mutattak a HNK-1-el, megerősítve, hogy ezek ganglionléc eredetű sejtekből differenciálódott képletek. A HNK-1 ellenanyag nem ismeri fel az egér ENCC-t (Young és Newgreen 2001). A csirke eredetű ENCC-k neuronális és glia differenciáláson mentek át. A transzplantált egér utóbélben normális simaizomréteg fejlődött ki, és a ganglionléc-eredetű sejtek csak a plexus myentericus területén differenciálódtak. A kiméra bélel hasonló korú (E16.5) egér embryo p75 és HuC/D ellenanyagokkal festett bélidegrendszere igazolja, hogy az embryonális vastagbél szintén csak plexus myentericus-szal rendelkezik, a plexus submucosus rágcsálókban a születés után jelenik meg (30. ábra). Fontos megjegyezni, hogy a ganglionléc-eredetű sejteken túl, a fogadó embryoból származó endothel sejtek is megtalálhatók a graft területén.



**29. ábra: Csirke-fürj embryonális bélkiméra. A.)** A QCPN ellenanyag fürj sejteket jelöl a primitív testüregbe transzplantált embryonális bélben, kivéve a neurális plexusokat, amelyek nem festődnek (nyílhegyek). **B-G.)** A QCPN- neurális plexusok területe 8F3+ csirke sejteket tartalmaz **(B)**, amelyek szintén expresszálták a HNK-1 ganglionléc markert **(C)**, neuronális markereket **(D-F)**; HuC/D, neurofilamentum, NADPH), illetve glia specifikus B-fabp-t. A graft bélidegrendszerének immunfenotípusa megegyezik az azonos korú embryonális vastagbél keresztmetszeteinek HuC/D és B-fabp expressziót mutató neuronok és glia eloszlásával. ep: epithelium, mp: plexus myentericus, smp: plexus submucosus.

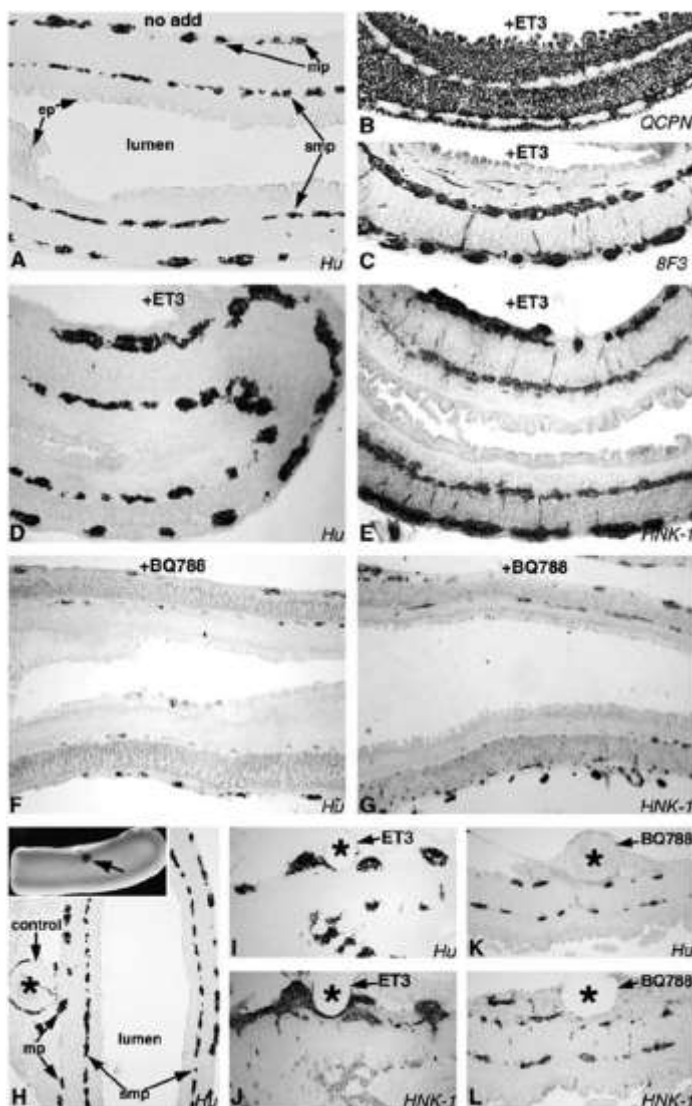




**30. ábra: Csirke-egér embryonális bélkimerában csak a plexus myentericus fejlődik ki. A, B.) 11.5 napos egér embryóból izolált utóbél morfológiája a testüregbe történő beültetés előtt és után. C.) Az egér bél 8F3+ csirke sejteket tartalmaz, amelyek HNK-1 ganglionléc markert (D,I) , csirke specifikus glia és neuronális markereket (E-G; HuC/D, neurofilamentum), illetve NADPH-t (H) expresszálnak. J-L.) A graft bélidegrendszerének immunfenotípusa megegyezik az azonos korú egér embryonális vastagbél keresztmetszeteinek p75, HuC/D és B-fabp expressziós mintázatával. ep: epithelium, mp: plexus myentericus.**

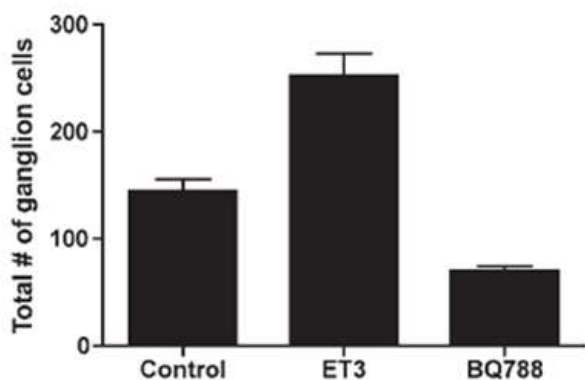
#### 4.3.3. Az EDNRB jelátvitel gátlása utóbél hypoganglionózist okozza.

A szervtenyésztés során (28. ábra) igazolódott, hogy EDN3 jelátvitel hiányában az ENCC-k nem képesek áthaladni a coecum területén. Az EDN3 utóbél idegrendszerének fejlődésében játszott szerepét csirke-fürj béltranszplantációs kísérletekben tanulmányoztuk. Preganglionotikus (ENCC-t nem tartalmazó) utóbelet E5 fürj embryoból izoláltuk. A coecum, cloaca és a Remak-ganglion leválasztásával eltávolítottuk az intrinsic ENCC forrásként szolgáló struktúrákat. Az utóbeleket egy éjszakán keresztül szérum mentes sejtenyésztő médiumot tartalmazó (kontroll, n= 15; 31. ábra, A), 250 ng/ml EDN3-at (n= 36; 31. ábra B-E), vagy 20  $\mu$ M BQ788-at (n= 42; 31. ábra, F, G) tartalmazó kollagén mátrixba ágyazva tenyésztettük. Ezt követően a kollagén gélből eltávolított utóbeleket és 3 napos fogadó csirke embryo testüregébe transzplantáltuk. 7 nap inkubálást követően az EDN3 kezelt fürj utóbelek területén 8F3, HNK-1 és HuC/D immunreaktív csirke ganglionléc-eredetű ENCC-kből álló jól fejlett submucosalis és myentericus ganglionok figyelhetők meg (31. ábra, B-E). Ezeknek a ganglionoknak a száma és mérete egyaránt jelentős növekedést mutat a nem kezelt bélhez képest (31. ábra, A). Ezzel szemben a BQ788-al kezelt utóbélben kifejezett hypoganglionózis figyelhető meg, a bélfalban mindössze néhány kisebb méretű enterális ganglion látható (31. ábra, F, G). A kezeletlen, az EDN3-kezelt és a BQ788-kezelt utóbél területén összeszámolt, teljes ganglionszámra vonatkoztatott összefoglaló adatsor a 32. ábrán látható. Az EDN3 kezelés szignifikáns hyperganglionózist, míg az EDNRB aktivitás gátlása súlyos hypoganglionózist eredményezett. Az ENCC-k számát befolyásoló hatás egyformán érinti a submucosalis és a myentericus plexust. Amikor BQ788-al vagy EDN3-al bevont mikrogöngyöket ültettünk a testüregbe transzplantált embryonalis bél falába (31. ábra, H-L) az EDN3-al bevont mikrogöngyök közelében lévő enterális ganglionok a BQ788-al bevont mikrogöngyök szomszédságában található enterális ganglionok méretéhez viszonyítva szignifikánsan nagyobb méretűek voltak. Ez azt igazolja, hogy az EDNRB jelátvitel, coecumban betöltött szerepétől függetlenül, az utóbél területén található ENCC-k fejlődését is támogatja.



### 31. ábra: A megnövekedett EDN3 koncentráció hyperganglionózishoz vezet.

**A.)** E5 ürj utóbeleket 24 órás EDN3 fehérje **(B-E)** vagy BQ788 **(F, G)** kezelést követően E3 csirke embryo testüregébe transzplantáltuk, majd 7 napig inkubáltuk. A kontrollként szolgáló transzplantált bél hosszszelvényén normál ganglionok mutathatók ki. A hozzáadott EDN3 hatására a ganglionok méretében és számában jelentős növekedés figyelhető meg, ami a QCPN **(B)**, 8F3 **(C)**, HU **(D)** és HNK-1 **(E)** festés során egyaránt jól kivehető. Az EDN3 jelátvitel BQ788-al történő gátlása a HU **(F)** és a HNK-1 **(G)** immunreaktivitás alapján a ganglionok méretében és sejtszámában is jelentős csökkenést eredményeznek. **I, J.)** EDN3-al vagy BQ788-al **(K, L)** bevont acrylamide microgongyók preganglionotikus E5 ürj utóbélbe történő transzplantációját követően a graftokat E3 csirke embryokba ültettük. Kontroll microgongyót tartalmazó utóbél **(H, csillag)**. A bekeretezett ábra a microgongyót tartalmazó graftot közvetlenül a csirke testüregből történő izolálást követően mutatja. Az ET3-al bevont microgongyók jelenlétében **(I, J)** az enterális ganglionok mérete jelentősen növekedett a BQ788-al bevont microgongyó hatásának kitett ganglionokhoz képest **(K, L)**. ep, epithelium; mp, plexus myentericus; smp, plexus submucosus.



### 32. ábra: Az EDNRB jelátvitel gátlása hypoganglionózist eredményez.

Az EDN3-al vagy BQ788-al 24 órán keresztül kezelt, majd testüregbe transzplantált bélszakaszokat HNK-1-el festettük, majd kvantitatív analízist végeztünk. Nagy nagyítás (200X) mellett meghatároztuk a ganglion sejtek számát a nem kezelt, az EDN3 és BQ788 kezelt belek esetében (n=5 minden csoportból). A hibavonalak a mintaátlag standard hibáját mutatják. A statisztikai elemzések során az egy-változós variancia-analízist (ANOVA) követően Tukey-féle többszörös összehasonlító eljárást alkalmaztunk (PRISM szoftver). A P érték < 0.05 volt szignifikánsnak tekintendő. A különbség mindhárom csoport esetében statisztikailag szignifikáns, P<0.01 volt.

#### 4.3.4. Az EDN3 serkenti az utóbél területén található ganglionléc-eredetű sejtek osztódását.

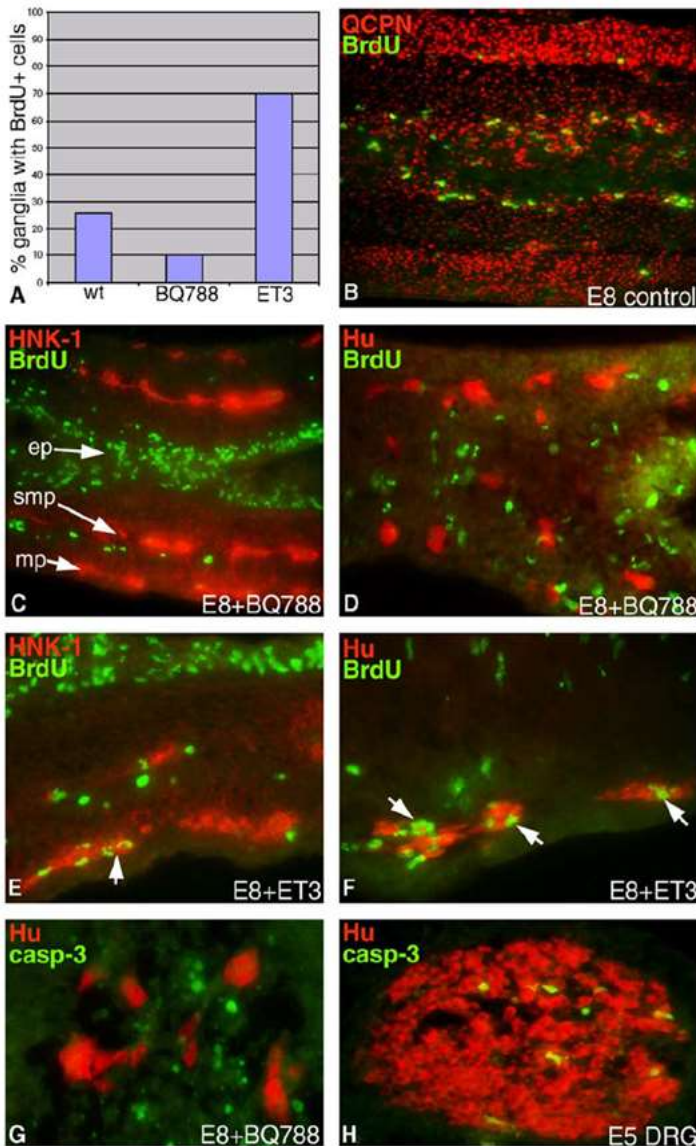
Az EDN3 enterális ganglionok méretére kifejtett pozitív hatás létrejöhet az ENCC-k proliferációja, túlélése vagy megváltozott differenciálódása miatt. Az EDN3 az ENCC-k proliferációjára kifejtett hatását BQ788 vagy EDN3 jelenlétében tenyésztett és BrdU-val kezelt bélszakaszokban tanulmányoztuk. A normál bélben számos BrdU+ epithelsejtet és elvértve (a ganglionok 10%-ban) BrdU+ ENCC-eket találtunk (33. ábra, A,B). A BQ788-kezelt belekben néhány ENCC expresszálta a BrdU-t (26%; 33. ábra, C, D). Ezzel ellentétben az EDN3 jelenlétében tenyésztett bélszakaszokban számos BrdU+ és HNK-1/Hu kettősen pozitív sejt (70%) figyelhető meg (33. ábra, E, F). A BQ788 kezelés sejtproliferációt csökkentő hatása nem specifikus sejttoxicitás és fokozott apoptózis eredménye; sem a normál utóbél, sem pedig az EDN3 (nem mutatott adat) vagy BQ788 jelenlétében nem tapasztaltuk az ENCC-k fokozott apoptózisát (33. ábra, G).

#### 4.3.5. Az EDN3 gátolja az utóbél neuronális differenciálódását.

BQ788 kezelés hatására az utóbél kolonizációja nem megy végbe. Ennek oka nem csupán a ganglionléc-eredetű sejtek proliferációjának gátlása, hanem a korai differenciálódás együttes következménye. A neuronális differenciálódás összehasonlítására a tenyésztett utóbélből készített metszeteken meghatároztuk a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) diaphorase aktivitás mértékét. Az idegszövetben a NADPH-diaphorase aktivitás a nitric oxid szintáz expresszióval ko-lokalizál (NOS) (Balaskas és mtsai., 1995; Branchek és Gershon, 1989; Burns és Delalande, 2005; Dawson és mtsai., 1991). A bélidegrendszerben a neurális NOS (nNOS) a terminálisan differenciálódott enterális neuronok egy alcsoportját jelöli (Young, 2005), míg a HuC/D és a neurofilamentum a neuron irányba elkötelezett sejtek korai markereiként ismertek (Fairman és mtsai., 1995; Payette és mtsai., 1984). E8 embyoban a NADPH-diaphorase aktivitás a teljes utóbél területén jelen van (34. ábra A). Az EDN3-al kezelt utóbelében a HuC/D és a neurofilamentum expresszió a bél teljes területén kimutatható (34. ábra, B). NADPH aktivitás azonban csak a középbél és a coecum területén mutatható ki, az utóbélben teljesen hiányzik (34. ábra, C), ami a neuronális differenciálódás késését jelzi. A B-fabp immunreaktivitás alapján a glia irányú differenciálódás nem gátolt (34. ábra, D). A BQ788 kezelésnek kitett bélben a neurofilamentum, a NADPH és



a B-fabp expresszió a középbél és a coecum területére korlátozódik (34. ábra, E-H), megerősítve ezzel az utóbél ENS kolonizációjának elmaradását, valamint igazolja a coecum területén lévő ENCC-k neuron és glia irányú differenciálódását. Összefoglalva, megállapíthatjuk, hogy az EDN3 gátolja az ENCC-k neuron irányú differenciálódását.

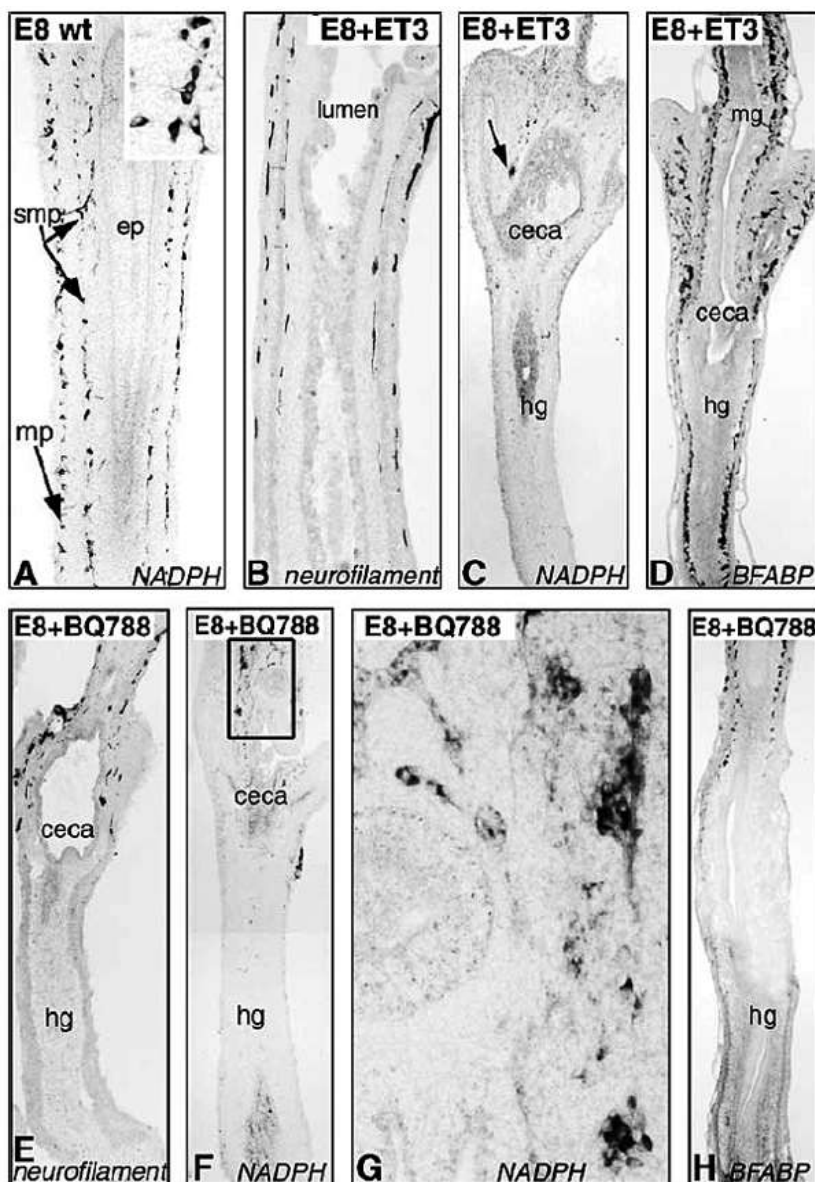


**33. ábra: Az EDN3 serkenti az ENCC-k proliferációját.** E5 utóbelet 3 napon át BQ788 (C, D), illetve EDN3 (E, F) jelenlétében tenyésztettük. A sejtek osztódására BrdU jelölést használtunk. A hozzáadott EDN3 jelenlétében tenyésztett beleken a kontroll és a BQ788-kezelt esetekhez képest szignifikánsan magasabb százalékban figyelhetők meg BrdU-pozitív ENCC-k (A). Az EDN3 kezelt utóbél tenyészetek számos BrdU és HNK-1 (E, nyíl) illetve BrdU és HU (F, nyíl) kettősen pozitív gangliont tartalmaznak. E8 BQ788 kezelt bél coecumának magasságából származó metszetek (G) kettős festése során anti-aktivált-kaspáz-3 antitesttel detektáltuk az apoptotikus sejteket és anti-HU-val jelöltük a neuronokat. G.) Apoptotikus epithelialis és mesenchymalis sejtek jelen voltak ugyan, de a HU és az aktivált kaspáz-3 kolokalizációt nem mutatott. H.) Pozitív kontrollnak dorsalis érző gangliont használtunk. DRG, dorsalis érző ganglion; ep, epithelium; mp, plexus myentericus; mp, plexus submucosus.

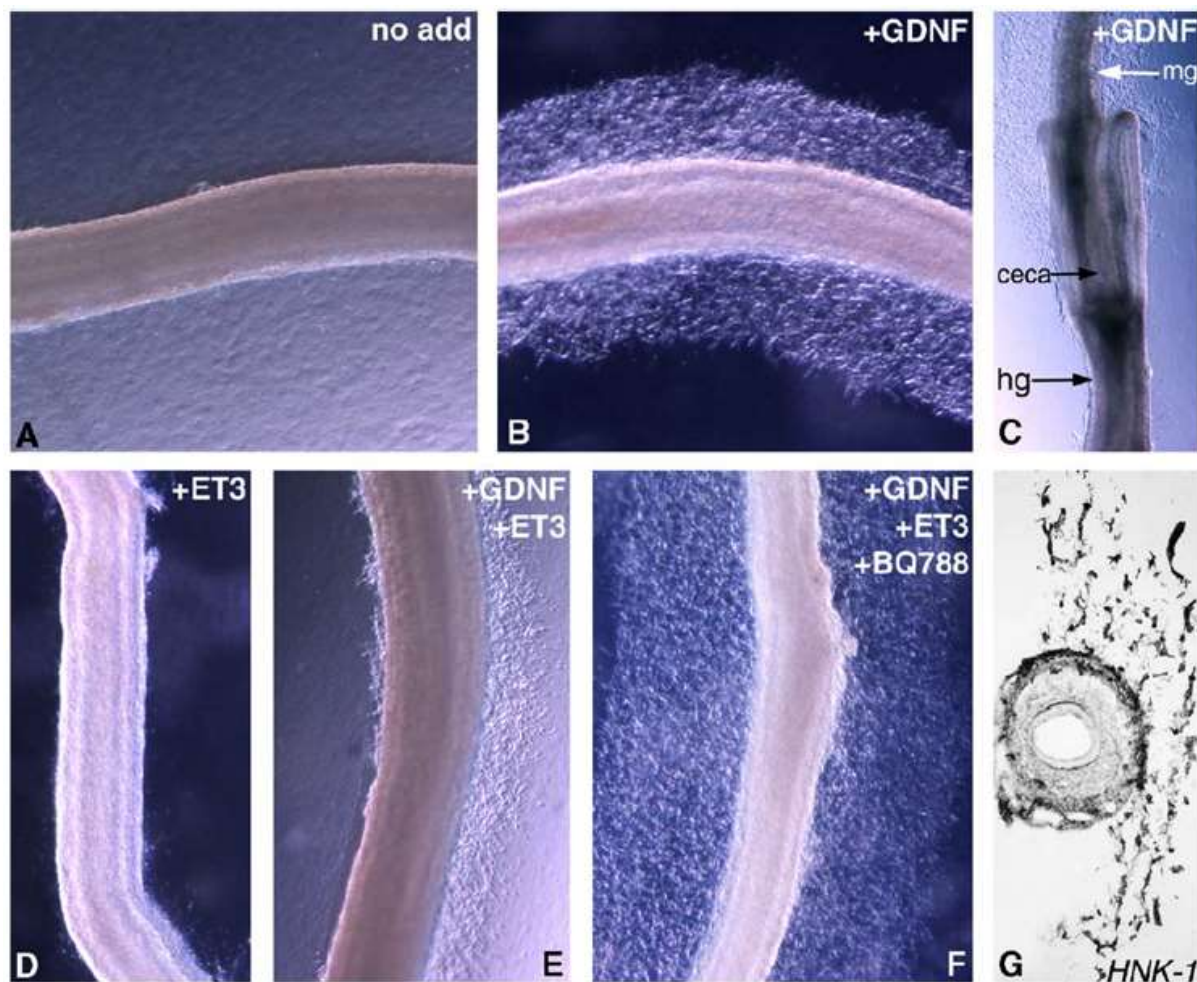
#### 4.3.6. Az EDN3 gátolja a ganglionléc-eredetű sejtek GDNF-által indukált vándorlását.

Patkány és egér embryokon végzett kísérletek szerint az EDN3 szabályozza a GDNF-el indukált ENCC-k migrációját (Barlow és mtsai., 2003; Kruger és mtsai., 2003). Ennek a megfigyelésnek madár embryoban történő vizsgálatára E8 embryonális belet GDNF jelenlétében (35. ábra, B, C), illetve hozzáadott növekedési faktor nélkül (35. ábra, A) 3D-kollagén gélben tenyésztettük. GDNF hatására a középbél és a coecum területéről jelentős

ENCC kivándorlás figyelhető meg a környező kollagén gélbe. Érdekes módon azonban az utóbél területéről a GDNF nem okozott kivándorlást (35. ábra, C). Az EDN3 hozzáadása önmagában nem eredményezett ENCC kivándorlást (35. ábra, D). Ugyanakkor az EDN3 és a GDNF együttes hozzáadására a kivándorlás jelentősen kisebb mértékű volt (35. ábra, E). Az EDN3 sejt migrációt gátló hatását a BQ788 hozzáadása megszüntette, minek következtében a GDNF-t tartalmazó kollagén mátrixban fokozott HNK-1+ ENCC sejt vándorlás volt megfigyelhető (35. ábra, F, G).



**34. ábra: Az EDN3 gátolja a bélidegrendszer neuronális differenciálódását. A.)** 8E embryokban a NADPH-diaphorase aktivitás az utóbél teljes szakaszán kimutatható. **B.)** A 3 napig hozzáadott EDN3 jelenlétében tenyésztett E5 utóbél teljes hosszában megtalálhatók a neurofilamentumot tartalmazó sejtek **C.)** NADPH aktivitás csak a középbél és a coecum területén mutatható ki, az utóbél területén hiányzik **D.)** A B-fabp immunreaktivitás a glia irányú differenciálódást mutatja. **E-F.)** A BQ788 kezelés nem befolyásolja a középbél és a coecum neuro-filamentum (E) és NADPH expresszióját (F). **G.)** Az F ábrán bekeretezett terület kinagyítva. **H.)** B-fabp expresszió a glia differenciálódását mutatja.



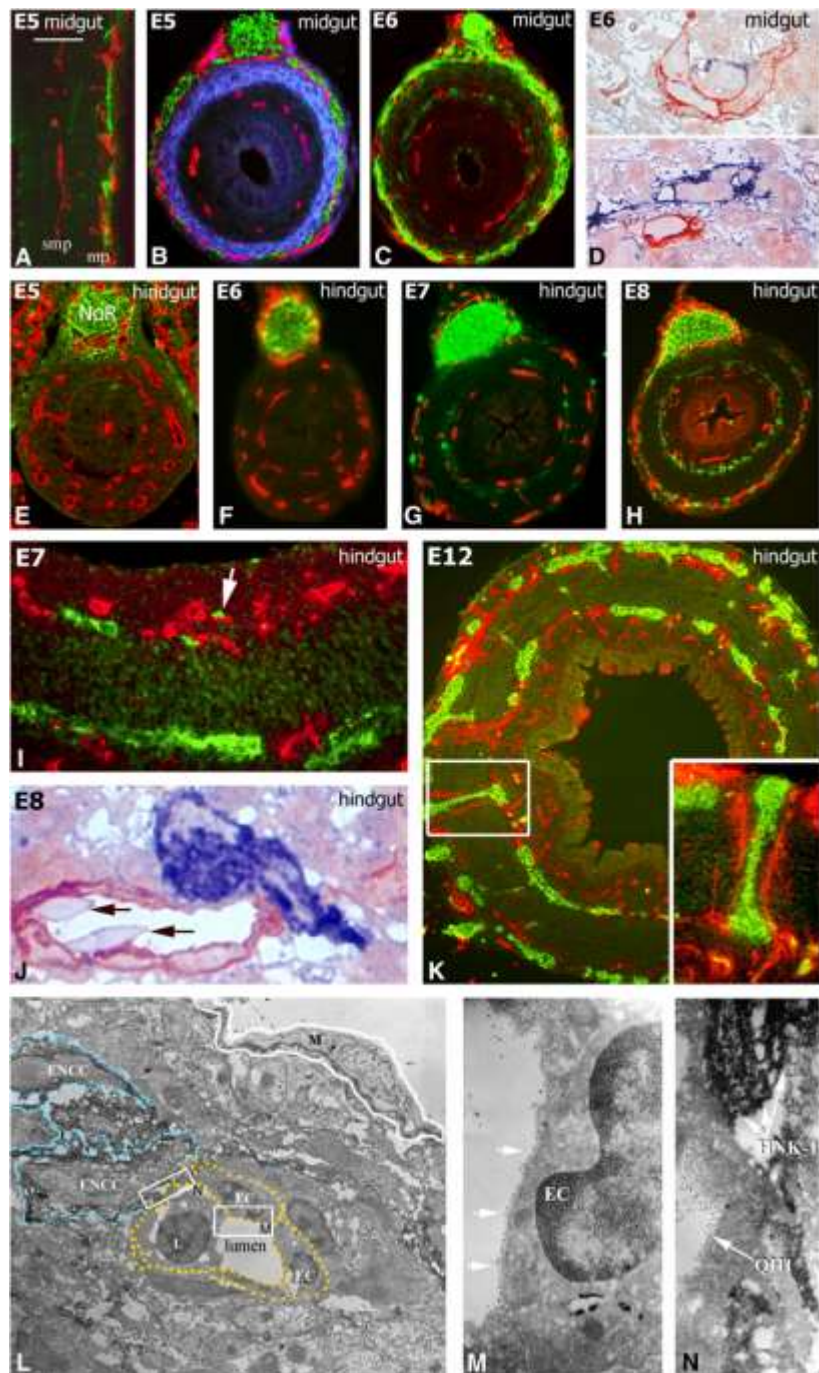
**35. ábra: Az EDN3 gátolja a GDNF chemoattraktáns hatását.** E8 bél kollagén gélben történő tenyésztése hozzáadott faktorok nélkül (A), illetve 10ng/ml GDNF (B, C), 250 ng/ml EDN3 (D), GDNF+ EDN3 (E) vagy GDNF+ EDN3+ 5uM BQ788 (F) jelenlétében. A GDNF normál esetben stimulálja a ganglionléc-eredetű sejtek középbélből kollagén gélbe történő vándorlását (B, C). Az EDN3 jelenléte gátolja a GDNF által indukált sejt vándorlást (E). A BQ788 hozzáadása mérsékeli az EDN3 gátló hatását (F). A vándorló sejtek HNK-1 immunreaktivitást mutatnak, ami igazolja a sejtek ganglionléc eredetét (G). hg, utóbél; mg, középbél.

#### 4.4. Az endothél sejtek szerepe a vastagbél idegrendszer fejlődésében.

A bélidegrendszert létrehozó ganglionléc eredetű őssejtek differenciálódása, osztódása, és vándorlási képessége nagymértékben függ az ENCC-k és a környező szövetek (mesenchyma, endothél, hámsejtek) közötti kölcsönhatásuktól. 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 submucosus plexusok területén. Ez a véletlenszerű morfológiai megfigyelés vetette fel azt az elképzelést, hogy az endothél sejtek a bélidegrendszer prekurzorainak vándorlását és differenciálódását befolyásolhatják.

A vérerek fejlődése és az ENCC-k vándorlása közötti kapcsolatot QH1 (fürj endothel specifikus ellenanyag; Pardanaud és mtsai., 1987) és az ENCC-ket felismerő HNK-1 ellenanyag használatával tanulmányoztuk. Az E5 fürj distalis középbélszakaszának submucosalis és myentericus rétegében az endothel sejtjei már akkor megjelennek, mikor az ENCC-k még csak a myentericus területet kolonizálták (36. ábra, A, B). A myentericus terület endothel sejtrétege és az ENCC-k kezdettől fogva egymás közelében helyezkednek el. E6 stádiumban (HH30), a distalis középbél submucosalis plexusa is elkezd kialakulni, itt is az endothel sejtek és az ENCC-k között szoros kapcsolat figyelhető meg (36. ábra, C, D). Az E5 (HH27) és E6 (HH30) preganglionotikus utóbélben az endothel sejtek már az ENCC-k kolonizációja előtt két koncentrikus plexusban helyezkednek el (36. ábra, E, F). Az ENCC-k által már kolonizált, E7 (HH33, 36. ábra, G) és E8 (HH36, 36. ábra, H) embryonális utóbél QH1 és a HNK-1 kettős festése megerősíti, hogy az endothel sejtekkel bélelt kapillárisok helyzete már akár két nappal korábban előre kirajzolja a colorectumba érkező ENCC-k későbbi mintázatát. E8 stádiumtól (HH36) kezdve, az ENCC-k és az endothél sejtek egymás közelében, két koncentrikus gyűrűt formázva helyezkednek el (36. ábra, H). E7 embryo (HH33) hosszmeteszetein is megfigyelhető a vándorló ENCC-k és az endothel közötti kapcsolat (36. ábra, I): a submucosalis plexus területén vándorló ENCC-k legelől haladó csoportja láthatóan az endothél mentén halad proximo-distalis (balról jobbra) irányba. Nagyobb nagyításon az endothél sejtek és az ENCC-k közvetlen kapcsolata is igazolható, ami az E8 (HH36) utóbél félvékony (1  $\mu$ m) meteszetein jól kivehető (36. ábra, J). Későbbi stádiumokban az endothél és bélidegrendszer anatómiai közelsége a plexus submucosus és a myentericus ganglionok között húzódó interplexus rostok területén is egyértelműen kivehető (36. ábra, K).





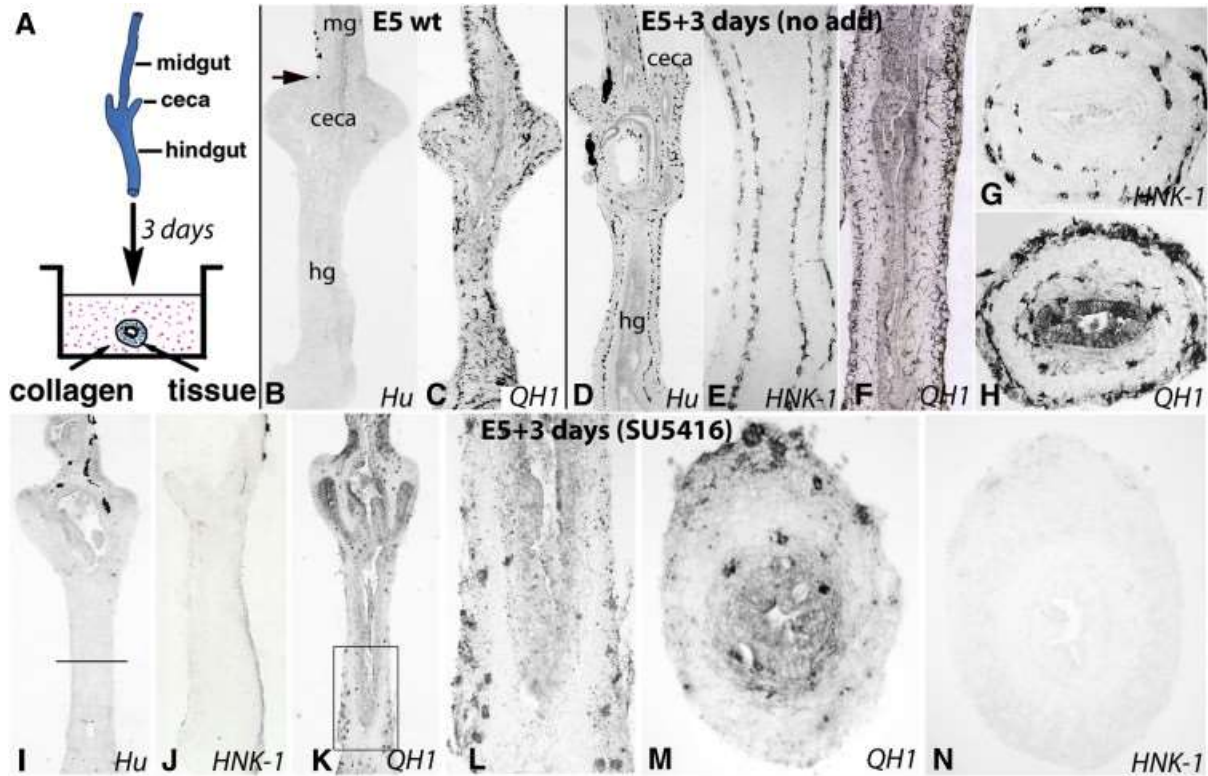
**36. ábra: Az ENCC-k az endothel sejtekhez asszociáltan kolonizálják a béltraktust.**

Fürj embryok közép (A-D) és utóbél szakaszát (E-K) QH1 (piros), HNK-1 (zöld A-C, E-I, K vagy kék (D-J) és SMA (kék, B) antitestekkel jelöltük. E5 (HH27) embryo középbelének hossz-, illetve keresztmetszetén (A,B) a myenterális ENCC-k és az erek közelsége figyelhető meg. C.) A submucosális ENCC-k E6 stádiumban (HH30) a már kialakult endothelialis hálózat mentén vándorolnak. D.) E6 (HH30) középbél félvékony metszetén az ENCC-ek (kék) és az endothel sejtek (piros) között szoros kapcsolat figyelhető meg. E5 (HH27; E) illetve E6 (HH30; F) embryo utóbélében az endothel sejtek már két koncentrikus gyűrűként ábrázolódnak, előre jelezve a később ide érkező ENCC mintázatát, amelyek E7 (HH33, G) stádiumban érik el az utóbél középső szakaszát, ahol 8 napos embryonális kortól (HH36; H) kezdve már két koncentrikus körbe rendeződve figyelhetők meg. E7 (HH33) utóbél hosszmetzetén (I; distalis vége jobbra, lumen lefelé) azonosíthatók a myenterális plexust kolonizáló, lefelől haladó ENCC-k (nyíl). E8 (HH36) utóbél félvékony metszetén megfigyelhető az endothel sejtek (piros) és az ENCC (kék) kapcsolata (J), az erekben néhány vörösvértest (J, nyíl) is látható. Az erek és az ENCC-k közelsége E12 (HH40) stádiumban már egyértelműen a belső plexus területén is kirajzolódik (K, a bekeretezett terület nagyított felvétele). E8 (HH36) utóbél elektronmikroszkópos felvétele igazolja a HNK-1+ ENCC-k (kékkel körülhatárolt terület) és a QH1+ endothel sejtek (sárgával körülhatárolt terület) kapcsolatát. A kapillaris lumenében egy leukocytá (L) látható. Az L ábra bekeretezett területei az M és az N ábrán láthatóak kinagyítva, a QH1+ endothel sejtek arany szemcsével jelöltek (M, nyíl). ENCC, enterikus ganglionléc-eredetű sejt; EC, endothel sejt; L, leukocytá; M, mesothel sejt; mp, plexus myentericus; smp, plexus submucosus.

E8 (HH36) fűrj utóbélben immunelektronmikroszkópos technikával is igazoltuk az endothel és az ENCC-k közötti sejt-sejt kapcsolatot (36. ábra, L-N). E8 (HH36) fűrj utóbél vibratom metszeteinek kettős immunhisztokémiai jelölése után elektronmikroszkópiára is készítettünk ultravékony metszeteket. A HNK-1 expressziót DAB-NiSO<sub>4</sub>-al jelöltük, ami fekete csapadék formájában jelent meg, a QH1-et pedig streptavidin-konjugált 10 nm-es arany szemcsével mutattuk ki. A 36. ábra, L képén, valamint az 36. ábra, M, N képén kinagyítva a bélfalban található kis ereket szegélyező QH-1+ endothel és a HNK-1+ ENCC sejt egymáshoz viszonyított helyzete látható.

#### 4.4.1. Az endothel sejtek szükségesek az ENCC vándorláshoz.

Az erek ENCC-k vándorlásában betöltött szerepét izolált bélszakaszok szervtenyésztésében vizsgáltuk. Pan-VEGFR (vaszkuláris endothel növekedési faktor receptor) inhibitor SU5416-tal (Tille és mtsai., 2003) gátoltuk a kapillárisok kifejlődését. Az SU5416 a VEGF-receptor tirozin-kináz aktivitását gátolja (Mendel és mtsai., 2000). A kontrollként szolgáló E5 (HH27) fűrj bél explantátumot hozzáadott fehérje nélkül, 72 órán keresztül, kollagén gélben tenyésztettük. E5 (HH27) fűrj embryóban, hasonlóan a csirkéhez, a HuC/D+ ENCC-k a distalis középbél területén járnak (37. ábra, B), míg a QH-1 immunreaktív endothel sejtek a teljes bél hosszában jelen vannak (37. ábra, C). A 3 nap tenyésztést alatt, az ENCC-k egészen a distalis utóbél területéig elvándoroltak (37. ábra, D, E), a QH-1-immunfestés az endothel sejtek normál eloszlását mutatja (37. ábra, F). Az utóbél keresztmetszetén megfigyelhető, hogy ebben a stádiumban már az ENCC-k és az endothel sejtek is két koncentrikus gyűrűbe rendeződnek (37. ábra, G, H). Az SU5416 jelenlétében tenyésztett bélben a bél distalis területe ganglionmentes maradt, az ENCC-k vándorlása a középbél distalis területén megállt (37. ábra, I, J), az endothel sejtek elszórtan, rendezetlen csoportokat alkotnak (37. ábra, K-M). Az SU5416 kezelt bélszakaszokban bekövetkező aganglionózist a HNK-1-immunreaktív sejtek hiánya támasztja alá (37. ábra, N). A kialakult aganglionózis mértéke az inhibitor hozzáadásának időpontjától is függ. Az SU5416-ot 6 napos (HH30) embryonális bélhez hozzáadva a vándorlás distalisabban, az utóbél proximális szakaszán áll meg (nem mutatott adat).



**37. ábra:** Az endothél sejtek jelenléte szükséges a bélidegrendszer fejlődéséhez. E5 (HH27) fűrj embryok bélszakaszát a sematikus ábra szerint (A), 3 napig kollagén gélben tenyésztettük. Az E5 (HH27) embryo HuC/D-val festett utóbél hosszmetseteken az ENCC-k csak a középbél területén található (B), míg a QH1-gyel jelölt erek az egész béltraktusban jelen vannak C). A hosszmetsetek HuC/D (D) és HNK-1 (E) festése igazolja, hogy 3 nap tenyésztés alatt az ENCC-k a distalis utóbélbe vándoroltak, amit normál QH1 festődés kísér F). Az utóbél középső szakaszának keresztmetseti ábráján a HNK-1 (G) és QH1 (H) jelölés kirajzolja a két plexus mentén rendeződő ENCC és az endothél sejtek hálózatát. A kollagénhez adott VEGFR blokkoló SU5416 hatására az ENCC-k a coecum magasságában megállnak (I, J), amely együtt jár az erek fejlődésének jelentős megváltozásával (L, a K ábrán bekeretezett terület kinagyítva). Az utóbél I ábrán jelölt magasságban készített keresztmetsetén kevesebb és rendellenes helyzetű QH1+ sejt (M), valamint az ENCC-k teljes hiánya (N) figyelhető meg. hg, utóbél; mg, középbél; wt, normál.

#### 4.4.2. Az ENCC-k beta-1-integrint expresszálva vándorolnak az endothél sejteken.

A szervtenyészetekben kapott eredmények alapján felmerült, hogy az endothél sejtek szubsztrátként szolgálnak az ENCC-k migrációjához. A kérdés kísérletes megközelítésére először E5 (HH26) embryoból izolált középbélszakaszt kezeletlen műanyag tenyésztőfelszínre ültettük (38. ábra, A). 20 óra tenyésztés után mindössze néhány, a bélből nem túl messzire kivándorolt HNK-1+ ENCC figyelhető meg. A béltenyésztést Huvec (CD31+ humán köldökzsinórból izolált endothél) sejtek konfluens rétegén is megismételtük, ahol 20 óra alatt számos HNK-1+ ENCC vándorolt ki (38. ábra, B). Kontrollként csirke embryonális gyomorból izolált simaizom sejtek (38. ábra, C) és végtagbimbóból származó fibroblastok (38. ábra, D)

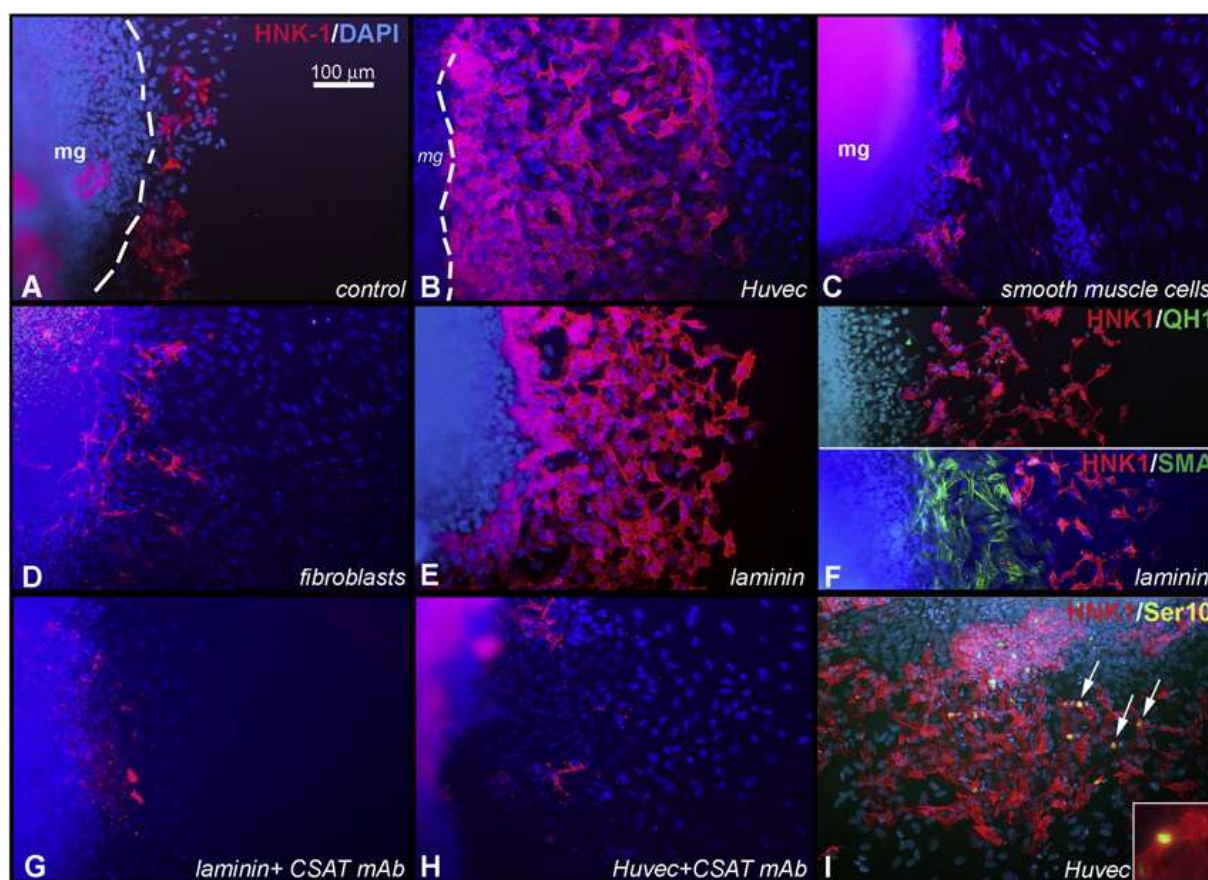


primer tenyészetét alkalmaztuk (Nagy és mtsai., 2001). A primer sejtvonalakon minimális ENCC vándorlás látható, ugyanakkor lamininnel (38. ábra, E) és fibronectinnel (nem mutatott adat) bevont felszíneken kifejezett ENCC vándorlást láthatunk. Az ENCC-el ellentétben, a bélfalból csak elszórt QH1+ endothel vagy SMA+ simaizom sejt kivándorlás volt megfigyelhető (38. ábra, F), ami igazolja, hogy az ENCC-k nem az endothel vagy simaizom sejteket követve vándoroltak ki. A beta-1 integrin funkciót blokkoló ellenanyag (klón: CSAT) hozzáadása, mind a laminin (38. ábra, G) és a Huvec sejtek (38. ábra, H) felszínén gátolta az ENCC vándorlását, míg a BoA1, csirke B sejtekre specifikus monoklonális ellenanyag (Igyártó és mtsai., 2008) jelenlétében normál vándorlás láttunk. Mivel a CSAT ellenanyag a madár-eredetű  $\beta 1$  integrinre specifikus (Testaz és mtsai., 1999) alkalmazása a Huvec sejteket nem érintette. Összefoglalva, a  $\beta 1$  integrin blokkoló CSAT nevű ellenanyag gátló hatása lecsökkentette a vándorló ENCC-k számát, valamint a sejtek migrációs távolságát is. Kaszpáz-3 immunreaktivitás alapján a CSAT kezelés, összehasonlítva a kontroll tenyészetrel, nem váltott ki fokozott apoptózist az ENCC-kben (nem mutatott adat). Annak érdekében, hogy meghatározzuk vajon az endothel sejtek jelenléte befolyásolja-e a tenyészetben lévő ENCC-k proliferációját, E5 (HH26) középbelet laminin, illetve Huvec sejtek jelenlétében, 20 órán keresztül tenyésztettünk, majd az ENCC-k mitotikus aktivitását HNK-1 és phosphohistone-H3 (Ser10) kettős immunfluoreszcens jelöléssel detektáltuk (38. ábra, I, nyíl). Ezután meghatároztuk a tenyészetekben azonosítható phosphohistone-H3/ HNK-1+ kettősen pozitív ENCC-ek arányát. A Huvec tenyészetben látható osztódó ENCC-ek százalékos aránya a  $9.9 \pm 6.0$ , míg a laminin tenyészetben  $5.7 \pm 2.4$  volt, mely összességében az ENCC-ek proliferációjának 1.7x növekedését jelenti ( $p < 0.05$ ). Hasonló összehasonlítást végeztünk a Huvec ( $11.6 \pm 3.2$ ) és fibronectin ( $4.0 \pm 1.9$ ) tenyészet között is, mely esetben 2.9x-es ENCC proliferáció növekedés volt megfigyelhető a Huvec tenyészet tekintetében ( $p < 0.001$ ). Ezek az eredmények azt igazolják, hogy az endothel sejtek az ENCC-k migrációját és proliferációját egyaránt serkentik.

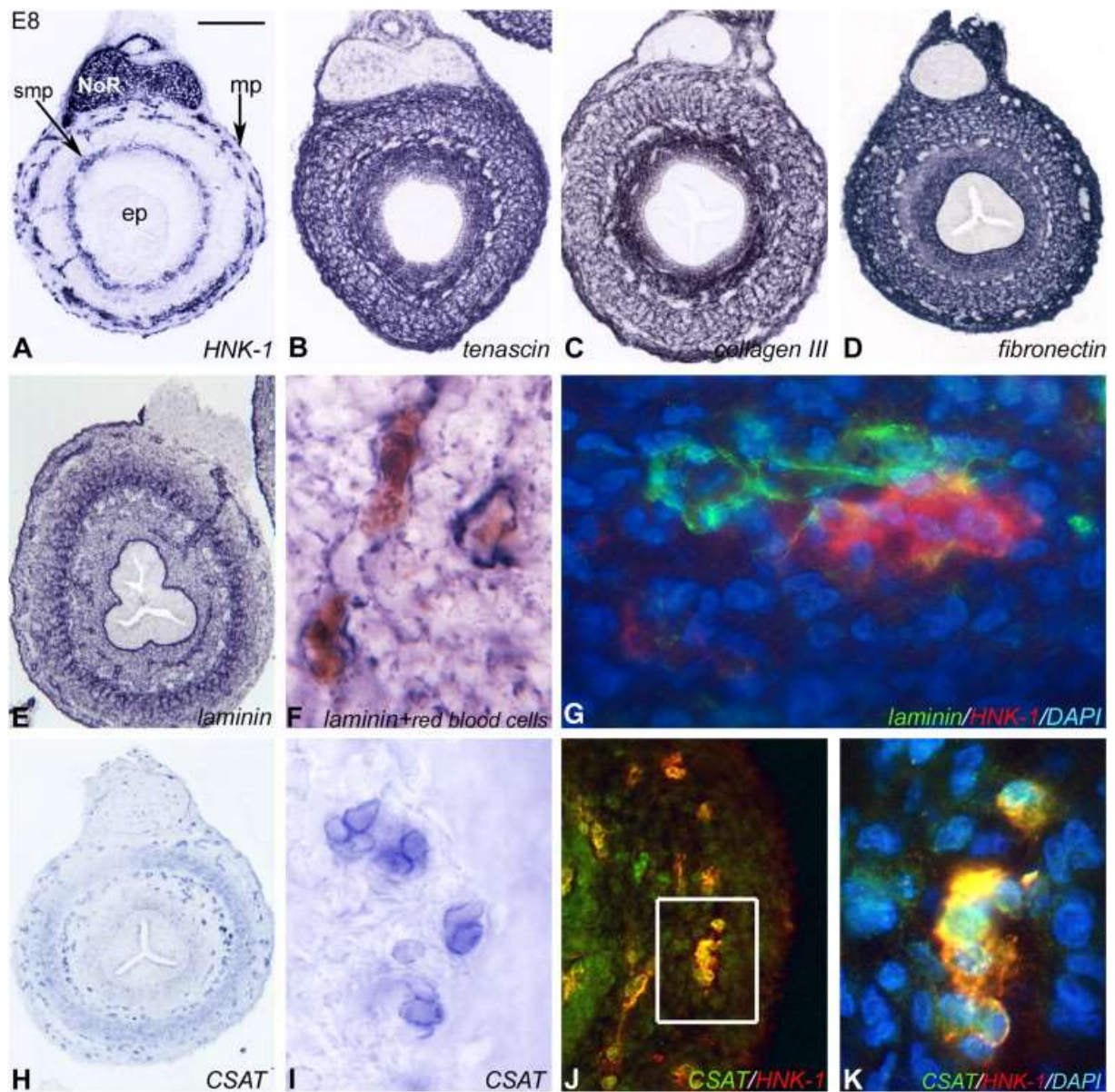
#### 4.4.3. A laminin kifejezett expressziót mutat a bél kapillárisok körül.

A CSAT ellenanyag ENCC migrációra és proliferációra kifejtett gátló hatása az endothel sejtekhez asszociált extracelluláris mátrix (ECM) fehérjék esszenciális szerepére utal. Az ECM fehérjék expresszióját E8 (HH36) utóbél metszetein hasonlítottuk össze. A 39. ábra, A-E képein a teljes bélmesenchymára kiterjedő erős tenascin-C, kollagén III, fibronectin és laminin

expresszió figyelhető meg. Ezen fehérjék expressziója hiányzik az epithelium, az idegi plexusok és a Remak-ganglion területén. Bár a laminin expresszió a teljes mesenchymára kiterjed (39. ábra, E), mégis a peroxidáz-pozitív erythrocyták alapján felismerhető erek környezetében kifejezettebb immunreaktivitást mutat (39. ábra, F). Az immunfluoreszcens festés kiemeli az erek körüli erősebb laminin expressziót és kirajzolja az erekhez-asszociált laminin, valamint a HNK-1+ ENCC-k szoros kapcsolatát (39. ábra, G). A korai ganglionléc sejtek felszínén expresszálódó CSAT antigén (Krotoski és mtsai., 1986) kifejeződése az ENCC-k felszínén is megfigyelhető (39. ábra, H, I), amit a HNK-1-el mutatott kolokalizáció igazol (39. ábra, J, K).



**38. ábra:** Az ENCC-k beta-1-integrinnel kapcsolódva vándorolnak az erek felszínén. E5 (HH26) csirke középbelt kezeletlen (A), illetve összefüggő Huvec sejtekkel (B), primer csirke-eredetű simaizom sejtekkel (C), primer csirke-eredetű fibroblastokkal (D), vagy lamininnel borított (E) műanyag felszínre helyeztük. Az ENCC-k különböző környezeti felszíneken történő vándorlását 20 óra elteltével HNK-1 immunfluoreszcens jelölésével (piros) detektáltuk. F.) Az intesztinális erek és a simaizom sejtek laminin felszínén történő vándorlását QH1 és SMA ellenanyagokkal vizsgáltuk. A CSAT ellenanyag az ENCC-k laminin (G) és Huvec felszínén (H) történő vándorlását egyaránt gátolta. I.) Az osztódó ENCC-ket HNK-1 és phosphohistone-H3 (Ser10) immunreaktivitásuk kolokalizációja alapján azonosítottuk (I, nyíl és bekeretezett terület). mg, középbél.

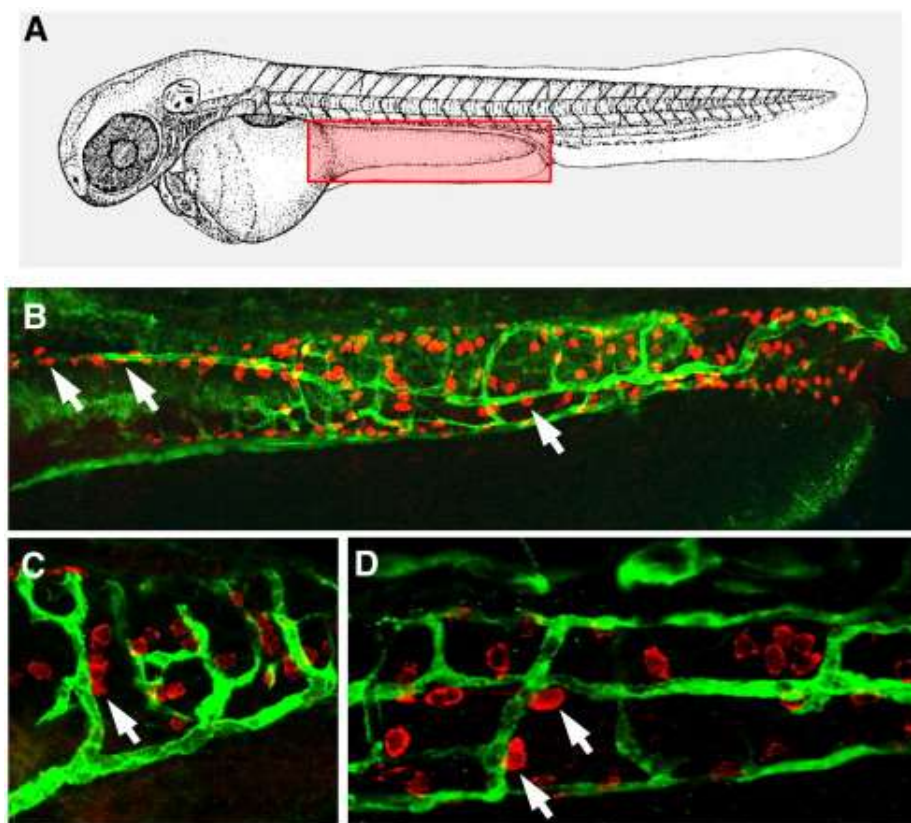


**39. ábra: A laminint expresszáló endothel sejtek és a beta-1-intergrint kifejező ENCC-k egymás közvetlen közelében találhatók.** A E8 (HH36) csirke embryo utóbél sorozatmetszetét HNK-1-el (A), tenascinnal (B), kollagén III-al (C), fibronectinnel (D) és lamininnel (E) festettük. A peroxidáz-pozitív vörösvértestek (F, barna) jelenléte alapján azonosított ereknek endothel sejteiben kifejezett laminin expresszió figyelhető meg (F, sötét kék). A HNK-1+ ENCC-k (G, piros) szoros kapcsolatot mutatnak a laminin+ erekkel (G, zöld). Beta-2-integrint felismerő CSAT ellenanyag a E8 (HH36) utóbél (H, I) myentericus és submucosalis plexusának területén egyaránt jelöl sejteket (H, I). A kettős immunfluoreszcens jelölés igazolja a HNK-1 (J és K, piros) és a CSAT (J és K, zöld) kolokalizációját. ep, epithelium; NoR, Remak-ganglion; mp, myentericus plexus; smp, submucosalis plexus.



#### 4.4.4. A zebrahal ENCC-k a bélfalban található erek mentén vándorolnak.

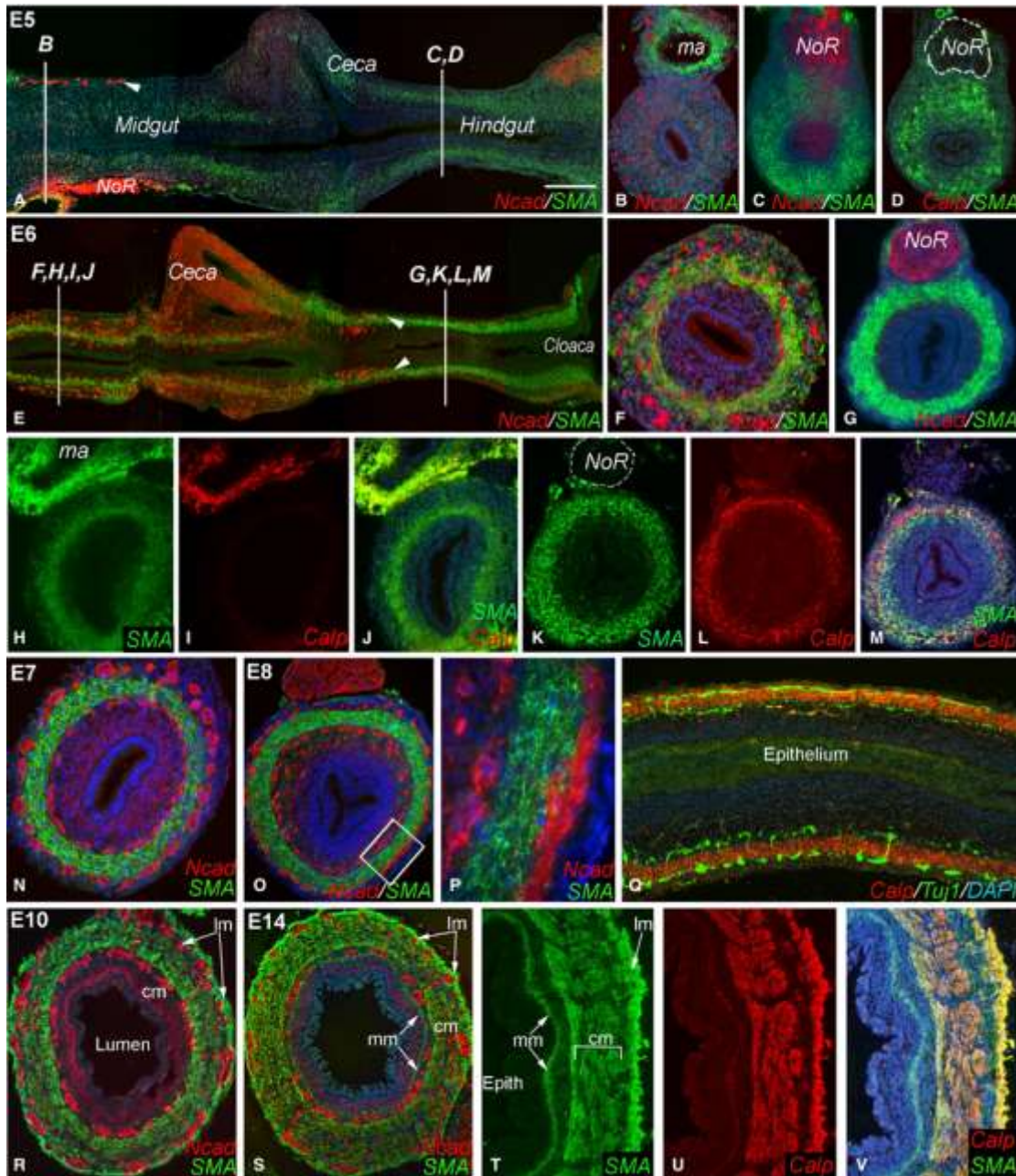
Az ENCC-k és az endothel sejtek közötti kapcsolatot, olyan transzgenikus zebrahal embryóban is megvizsgáltunk, ahol az összes endothel sejt GFP-vel jelzett. A *TG (fli:EGFP)* zebrahal embryót (Lawson és Weinstein, 2002) a fertilizációt követő (dpf) 2-6. napig hagytuk fejlődni. A madár embryokhoz hasonlóan, a zebrahal béltraktusában található erek is az enterális neuronok megjelenése előtt kimutathatók. Az subintestinalis erek már a 2 dpf stádiumban, jóval a HuC/D+ sejtek középső bélszakaszban való megjelenése előtt kimutathatók, a HuC/D+ sejtek majd csak a 3 dpf stádiumban jelennek meg. Az endothel sejtek és az ENCC-k relatív helyzetét 6 dpf stádiumban, a bél teljes ENCC kolonizációját követően (Shepherd és mtsai., 2004) vizsgáltuk. A HuC/D-immunreaktív enterális neuronok a vad-típusú embryo GFP-jelölt subintestinalis erei mentén rendeződnek (40. ábra, A-D). Az endothel sejtek és az enterális neuronok szoros közelsége a közép (40. ábra, C) és posterior (40. ábra, D) bélszakaszban egyaránt megfigyelhető.



**40. ábra: A zebrahal béltraktusában vándorló ENCC-k eloszlási mintázata a kapillárisokhoz hasonló elrendeződést mutat. A.)** A zebrahal embryo sematikus rajzának pirossal jelölt része a B-D ábrák mintavételi területét jelöli. **B.)** A 6 dpf *TG(fli1:EGFP)* vad-típusú embryóban megfigyelhető a HuC/D+ ENCC-k (piros) és EGF-jelölt endothel sejtek (zöld) kapcsolata (fehér nyíl). Ez a mintázat a közép- **(C)** és a posterior bélszakasz **(D)** területére egyaránt jellemző.

#### 4.5. A viscerális simaizom szerepe a vastagbél idegrendszerének korai fejlődésében.

A bélidegrendszer és a bélhuzam simaizom rétegének radiális mintázat mentén történő embryonális fejlődése térben és időben összehangoltan zajlik, de nem ismert, hogy a kétféle alapszövet fejlődése miként befolyásolja egymást. A csirke embryo fejlődő középbelében azt találtuk, hogy az  $\alpha$ -simaizom aktin (SMA) expressziója, amely az izmok korai differenciálódását jelzi, a vándorló ENCC-k érkezése után következik be. Ezzel szemben számos esetben megfigyeltük, hogy az utóbélben a simaizom differenciálódása megelőzi az ENCC-k bevándorlását. A simaizom és ENCC-k kölcsönhatását E5 – E14 csirke embryok közép-, és utóbélből készült keresztmetszeti és hosszanti metszeteken hasonlítottuk össze. Az E5 (HH26) embryonális stádiumban az SMA expressziója hiányzik a középbelből (41. ábra, A, B), ugyanakkor jelen van a distalis középbelben és az utóbélben (41. ábra, A, C), viszont ebben a fejlődési szakaszban a differenciált simaizomsejtekre jellemző calponin nem expresszálódik (41. ábra, D). E5 stádiumban az Ncadherin+ ENCC-k legelől haladó sejtpopulációja a középbel umbulicalis szakaszából átvándorolt a distalis középbel területére (41. ábra, B). Az E6 (HH29) stádiumban az SMA a középbelben és az utóbélben egyaránt expresszálódik, míg a coecalis telepekben még mindig hiányzik (41. ábra, F). Az ENCC-k legelől haladó csoportja ebben a fejlődési szakaszban a proximális utóbélbe halad (41. ábra, E). Az utóbél distalis része még nem kolonizált, de már jól fejlett körkörös izomzattal rendelkezik (41. ábra, G). Az E6 distalis középbelben az SMA intenzíven expresszálódik, de a calponin nem fejeződik ki (41. ábra, H), míg az utóbélben mindkét fehérje jelen van (41. ábra, M). Az E7 korban az SMA jelen van a középbel distális körkörös izomrétegében; a plexus submucosus és myentericus az SMA+ simaizomréteg két oldalán fejlődik (41. ábra, N). Hasonlóképpen az E8 (HH34) stádiumban, a két neurális plexus az utóbél körkörös izomrétegéhez asszociáltan differenciálódik (41. ábra, O, P,Q). Az E10 embryóban (HH36) a hosszanti izom a plexus myentericuson kívül alakul ki; a két neurális plexus közötti összekötő idegrostok láthatók (41. ábra, R). Az E14-ben (HH40) a lamina muscularis mucosae is differenciálódik (41. ábra, S). Ebben a szakaszban mindhárom izomréteget SMA és a calponin expresszió jellemzi (41. ábra, T-V). Az immunfluoreszcens festésekkel nyert adatok azt jelzik, hogy a bél simaizom rétege és a bélidegrendszer a distalis bélben eltérő időbeli fejlődési mintákat követ: az ENCC-k a középbelbe a simaizom differenciálódása előtt érkeznek, míg az utóbélbet az ENCC-k az SMA differenciálódás után, de a terminális differenciálódás előtt (a calponin nem expresszálódik) kolonizálják.



**41. ábra: A simaizom és a bélidegrendszer összehangolt fejlődése a csirke béltraktusának kialakulása során. A,B.)** E5 embryo simaizom aktin (SMA) expressziója alacsony intenzitást mutat a középbél és a coecum területén. **C,D.)** E5 utóbélben az SMA már kimutatható, calponin azonban még nincs jelen. Ebben a stádiumban az ENCC-k legelső csoportja a coecalis régiótól proximálisan figyelhető meg (A, nyílhegy; B). **E6** stádiumban az ENCC-k már benépesítik a proximális utóbelet (E, nyílhegy) és az SMA a közép (F), valamint az utóbél (G) területén egyaránt kimutatható. **H-J.)** E6 középbélben SMA expresszió kimutatható, calponin viszont nem fejeződik ki, csak a mesenterialis artériafal simaizmot tartalmazó rétegében látható. **K-M.)** E6 utóbélben mindkét fehérje kifejeződik. **E7** közép (**N**) és a **E8** utóbélben a körkörös simaizom és mindkét plexus megfigyelhető (**P**, az **O** ábra bekeretezett területe kinagyítva). **Q.)** E8 hosszmetnszeten a calponint expresszáló körkörös izomréteg mindkét oldalán láthatóak Tuj1+ enterális neuronok. **R.)** A 10 napos embryonális utóbélben már hosszanti simaizom is látható. **T-V.)** E14 embryoban már a muscularis mucosa is megfigyelhető (S) és az összes izomréteg expresszál SMA-t és calponint. Néhány esetben DAPI festés is alkalmaztunk, amit kék szín jelöl. Calp, calponin; cm, körkörös izomréteg; epith, epithelium; Im, hosszanti izomréteg; ma, arteria mesenterica; mm, muscularis mucosae; Ncad, N-cadherin; NoR, Remak-ganglion.

#### 4.5.1. Az utóbél simaizom rétegének kialakulása a bélidegrendszerrel függetlenül zajlik.

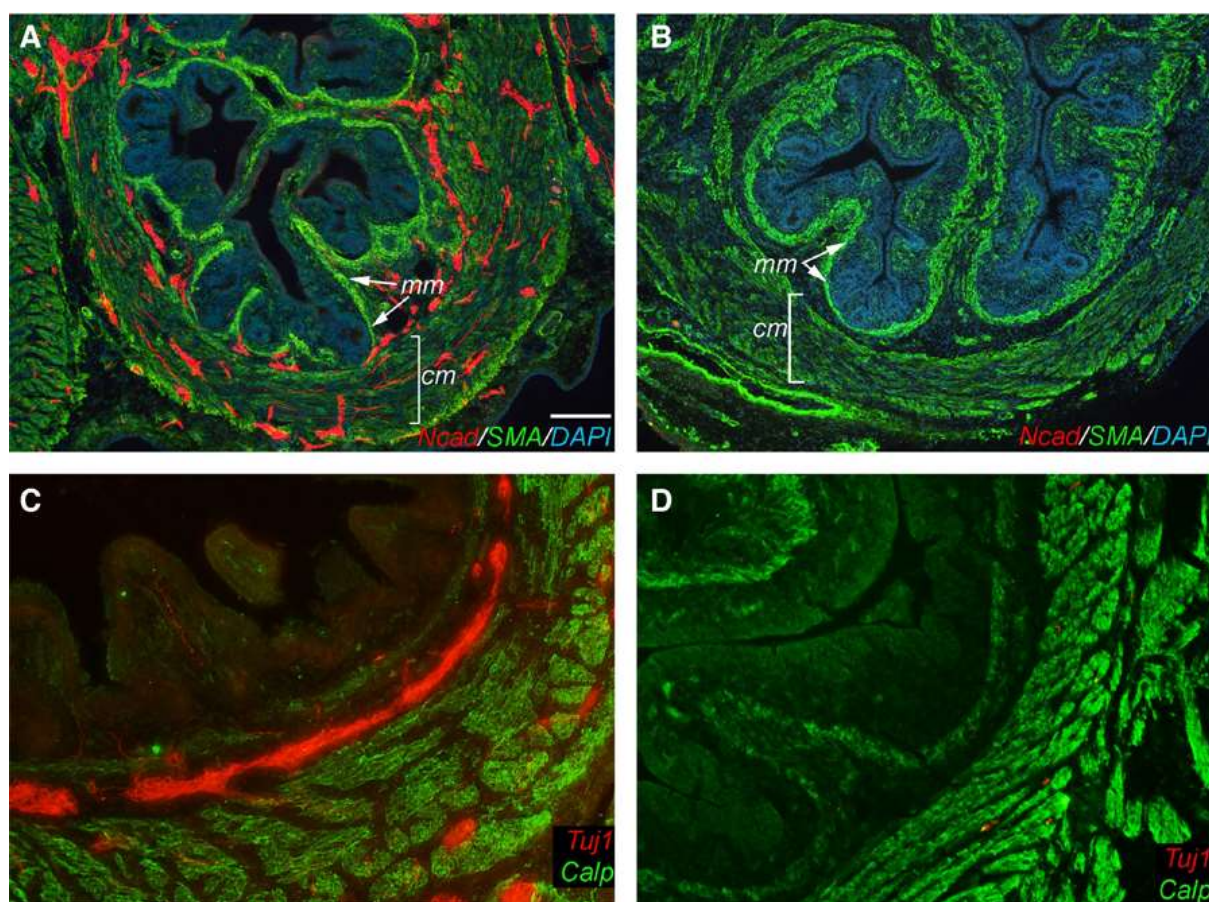
Annak meghatározására, hogy a bélidegrendszer jelenléte szükséges a simaizom képződéséhez, ganglionléc sejtekkel nem kolonizált embryonális E5 utóbél darabokat transzplantáltunk E9 (HH35) fogadó embryo chorioallantois membránjára (CAM) és 9 napig tovább tenyésztettük. A graftokról előzetesen a cloacat és Remak-gangliont eltávolítottuk, hogy megakadályozzuk az sacralis ganglionlécéből származó képletek ENCC hozzájárulását. A kísérleti graftok csak az ganglionlécmentes utóbelet tartalmazták, míg a kontroll graftok az umbilicus utáni középbél szakaszt is magába foglalták, és így ENCC-ket is tartalmaztak, amelyek képesek voltak kolonizálni a distalis utóbelet a CAM tenyésztés ideje alatt. A CAM tenyésztés végén a kontroll graftokban három izomréteget jelent meg (lamina muscularis mucosae, tunica muscularis interna et externa), amelyek kifejezik az SMA-t (42. ábra, A) és calponint (42. ábra, C). A CAM-ra transzplantált bélidegrendszer plexus myentericus és submucosalis is jelen van, amely NCAD + ENCC-ket (42. ábra, A) és Tuj1+ enterális neuronokat tartalmaz (42. ábra, C). A CAM graftok bélidegrendszerének fejlődési mintázata nagyon hasonló volt a normál E14 utóbeléhez (41. ábra, S). Az ENCC-ket nem tartalmazó kísérleti graftokban a várt módon nem alakult ki bélidegrendszer (42. ábra, B, D), de a simaizom normál SMA (42. ábra, B) és a calponin (42. ábra, D) expressziót mutatott (42. ábra, B), jelezve, hogy az utóbél simaizomfejlődésének mintázata nem függ a bélidegrendszer jelenlététől.

#### 4.5.2. A simaizom differenciálódásának gátlása rendellenes bélidegrendszerfejlődést okoz.

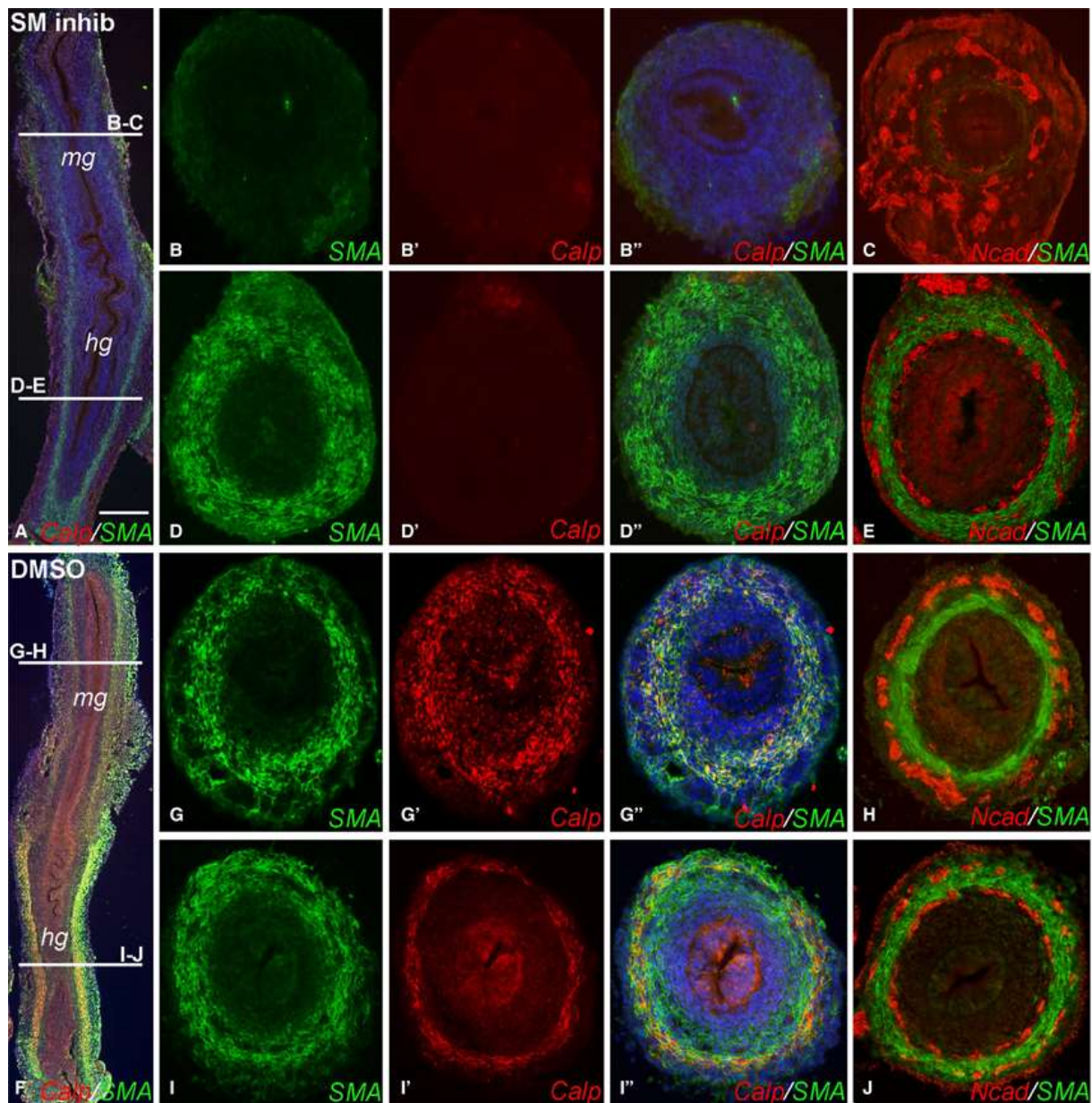
Az E5 (HH26) közép-, és utóbelet 3 napig függesztett szervtenyészetben a zsigeri simaizomfejlődést gátló FK506 és AG1295 jelenlétében tenyésztettük, hogy tanulmányozzuk a simaizom differenciálódás hatását a bélidegrendszer fejlődésére és eloszlási mintázatára. Az E5 béltraktus tenyésztése mindkét hatóanyag jelenlétében a simaizom fejlődésének teljes gátlásához vezetett kiemelten a distalis középbélben, amelyet megerősített az SMA (43. ábra, A, B) és a calponin (43. ábra, A, B') expressziójának hiánya. Az utóbelben a simaizom differenciálódását gátló reagensek nem gátolták az SMA expresszióját (43. ábra, A, D), de a calponin kifejeződése elmaradt (43. ábra, A, D'). A simaizom fejlődésének gátlása középbélben a bélidegrendszer rendellenes kialakulását eredményezte (43. ábra, C), aminek



kiemelt jellegzetessége a radiális mintázat elvesztése volt. Ezzel szemben a bélidegrendszer fejlődése az utóbélben -ahol az SMA expressziója nem volt gátolt- zavartalan volt (43. Ábra, E). Kontroll tenyésztetben a simaizom és a bélidegrendszer képződése a középbélben és az utóbélben nem változott (43. Ábra, F-J). Összefoglalva, az eredmények azt mutatják, hogy az erekhez hasonlóan a simaizom korai differenciálódása elengedhetetlenül szükséges a fejlődő bélidegrendszer szabályos radiális mintázatának kialakításában.



**42. ábra: Az intestinalis simaizom differenciációja független a bélidegrendszer kialakulásától.** Ganglionokat tartalmazó (A, C) és ganglionmentes (B, D) E5 csirke utóbeleket 9 nap chorioallantois membrán (CAM) tenyésztést követően SMA (A, B) és calponin (C, D) immunreaktivitásuk alapján vizsgáltuk. Az ENCC-k és a differenciálódó neuronok kimutatására N-cadherin (NCAD) (A, B) és Tuj1 (C, D) ellenanyagokat alkalmaztunk. A ganglionmentes utóbél simaizom fejlődése a bélidegrendszer hiányában is normál módon differenciálódott (B, D), a ganglionokat tartalmazó bélgraftban (A, C) hasonlóan zajlik. Calp, calponin; cm, körkörös izomréteg; mm, muscularis mucosae; Ncad, N-cadherin.



**43. ábra: A simaizom kialakulásának gátlása a bélidegrendszer radiális mintázatának rendellenes fejlődéséhez vezet. E5 bélszakaszt 3 napig FK-506 és AG-1295 simaizom inhibitorok (A-E), illetve kontrollként DMSO-t tartalmazó médiumban (F-J) függesztve tenyésztettük. Inhibitorok hatására a középbél területén a simaizom aktin (SMA) és a calponin expresszió (B-B'') egyaránt gátolt, az utóbélben azonban csak a calponin expresszió hiányzik (D-D''). Ezzel párhuzamosan a középbélben rendellenes ENS mintázat figyelhető meg (C), az utóbélben viszont normál bélidegrendszeri fejlődése látható (E). A kontroll bél közép- (G-H), és utóbélében (I-K) egyaránt normál SMA és calponin expresszió, valamint ENS mintázat figyelhető meg. Calp, calponin; hg, utóbél; mg, középbél; Ncad, N-cadherin.**

#### 4.6. A bél epithelium és a hám-mesenchymális kölcsönhatások szerepe a bélidegrendszer fejlődésében.

Epithelium-mesenchyma kölcsönhatásokat célzó *in vitro* kutatások szerint a mesenchymális milliő mellett hám-eredetű morfogének is nagymértékben meghatározzák a bélfal sejtjeinek differenciálódását. A Hedgehog növekedési faktor családba tartozó sonic hedgehog (SHH) fehérjét három évtizede azonosították először gerinces állatokban, valamint emberben. Az embryonális fejlődés kezdetén a gerinchúrban, 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, coecum, utóbél, cloaca) elkülönülését irányítja. Mutációja estén 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 (Sukegawa és mtsai., 2000; Ramalho-Santos és mtsai., 2000). Ezek a kísérletek ugyanakkor nem mutattak rá arra, hogy a SHH közvetlenül a ganglionlécs sejtekre hat vagy a bél mesenchymasejtek differenciálódásának befolyásolása révén szabályozza a bélidegrendszer kialakulását. A SHH jelátvitel bélidegrendszer fejlődésében betöltött szerepét morfológiai (*in situ* hibridizáció, hisztokémia, immuncitokémia, kettős immunfluoreszcencia, konfokális mikroszkópia), sejtbiológiai (szervtenyésztés, retrovírus-mediált génexpresszió) és fejlődésbiológiai (chorioallantois membrántenyésztés, testüregkiméra, szöveti rekombináció) módszereket ötvözve vizsgáltuk.

##### 4.6.1. A SHH és a PTC1 expressziója a bélidegrendszer fejlődése során.

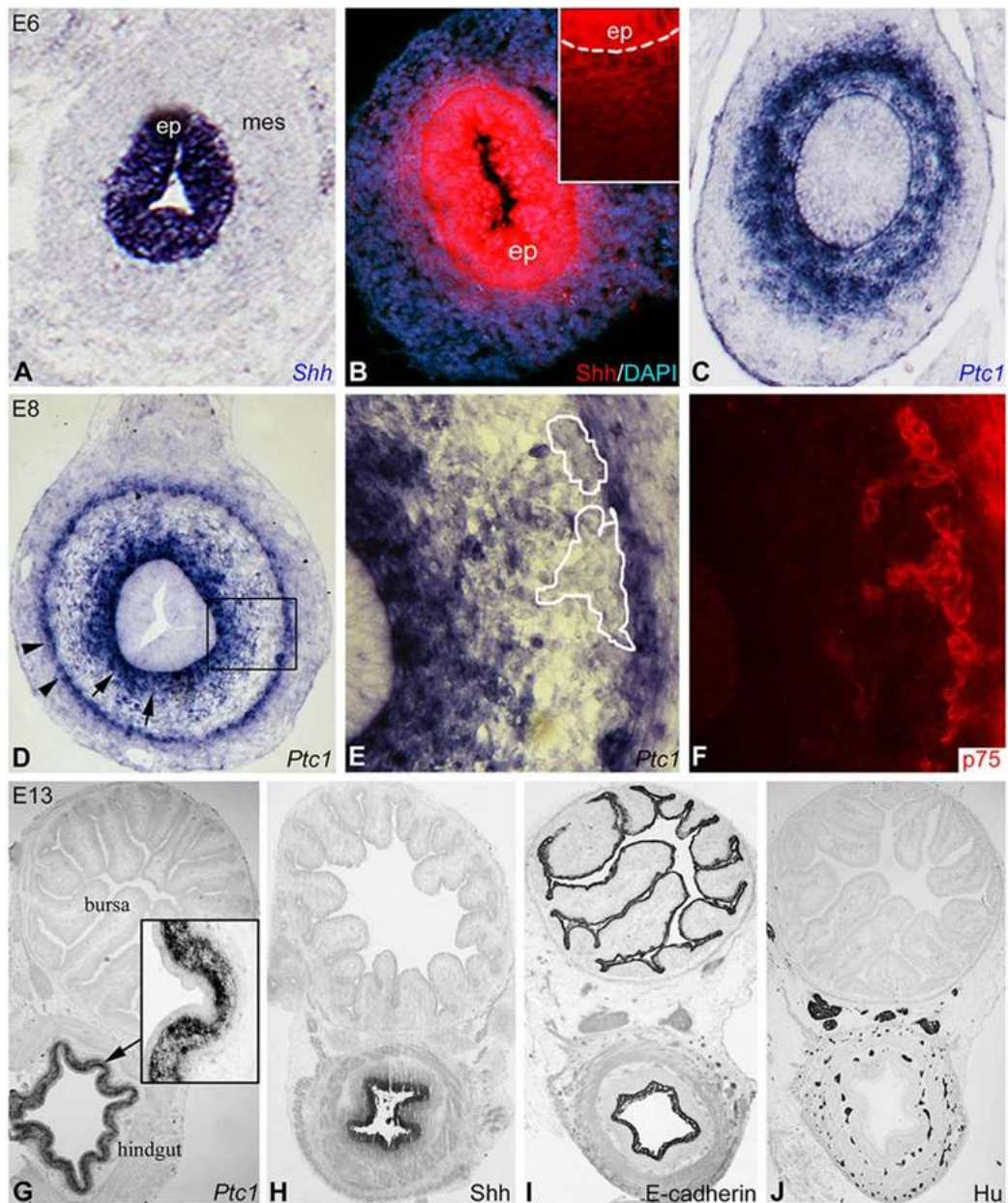
*In situ* hibridizációval (44. ábra, A) és immunfluoreszcenciával (44. ábra, B) E6 embryoban (HH28) kimutattuk, hogy a preganglionáris utóbél epitheliuma *SHH*-ot fejez ki. A párhuzamos metszetek SHH receptor Patched-1 (*PTC1*) *in situ* hibridizációja az epithelium alatti mesenchymában mutat expressziót (44. ábra, C). Amikor az ENCK eléri a distalis utóbelet (HH34) a *PTC1* az epithelium alatt és a bélfal szélén körkörösén is expresszálódik

(44. ábra, D). A külső mesenchymális *PTC1* expresszió láthatóan átfed a kialakuló plexus submucosus-szal, de a *PTC1 in situ* hibridizáció (44. Ábra, D,E) ENCC-t felismerő p75 immunfluoreszcens festésével kombinálva (44. ábra, F, Young és mtsai., 1998; Nagy és mtsai., 2012) nem mutatott kolokalizációt. Későbbi fejlődési stádiumában az E13 embryoban (HH39) a *PTC1* továbbra is kifejeződik a subepitheliális mesenchymában (44. ábra, G). A *SHH*-t specifikusan a bél epithelioma expresszálja (44. Ábra, H), míg a bursa Fabricii E-cadherin+ epithelioma (44. ábra, H) nem expresszál *SHH*-t (44. Ábra, H). A bursa Fabricii nem tartalmaz HU+ enterális neuronokat (44. ábra, J). 16 napos embryonális stádiumtól kezdve a *PTC1* expresszió eltűnik a külső mesenchymális rétegből és a lamina propria területére korlátozódik.

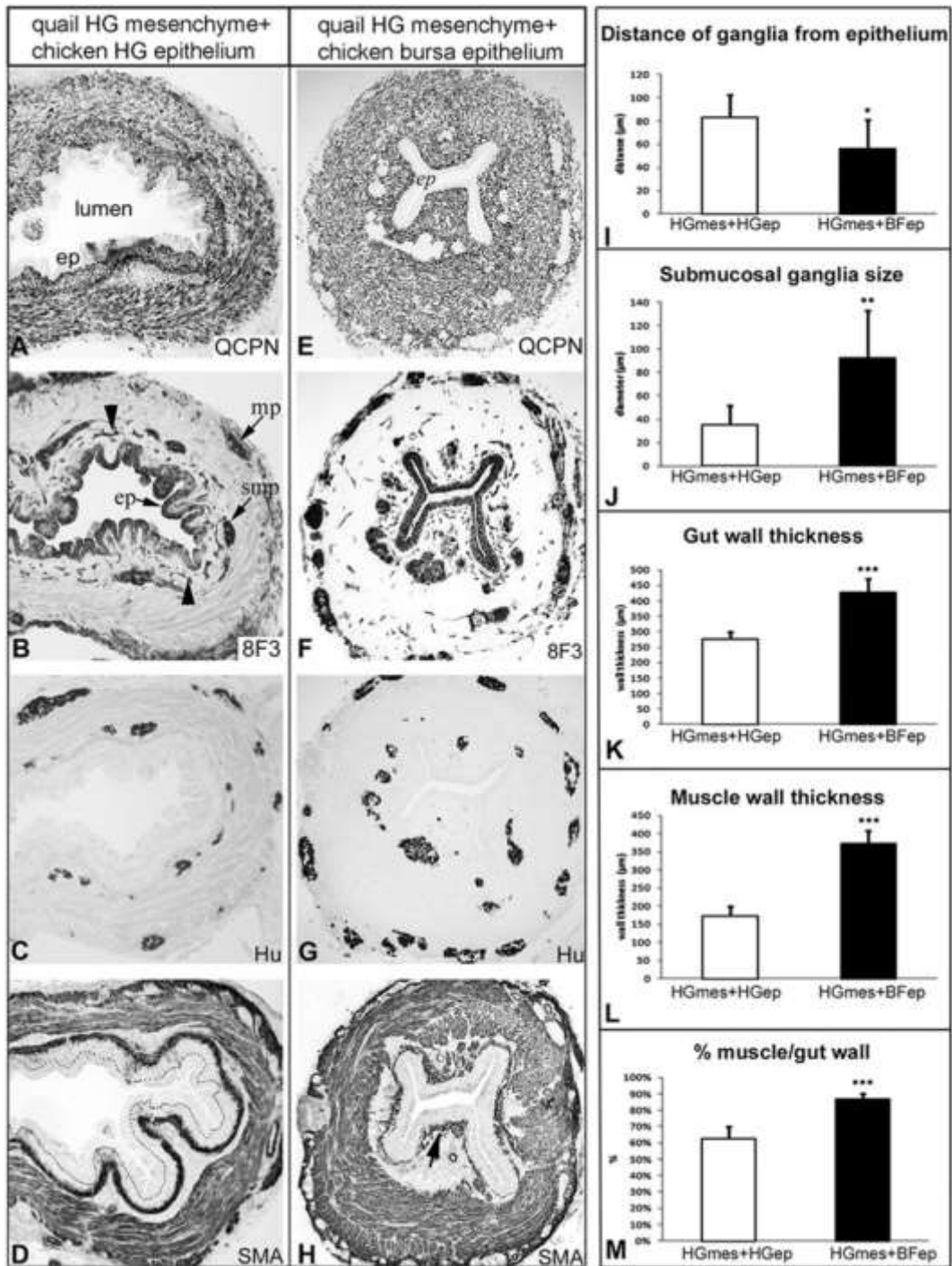
#### 4.6.2. A bél epithelioma meghatározó szerepet játszik a bélidegrendszer fejlődésében.

Az epithelium bélidegrendszer fejlődésében betöltött szerepét először csirke és fűj embryokból származó bursa Fabricii epithelium és utóbél mesenchyma szövetek rekombinációjával vizsgáltuk. Az utóbél distalis területén fejlődő bursa Fabricii (Nagy és Oláh, 2010) epithelioma *SHH*-t nem expresszál és nem tartalmaz ganglionléc eredetű sejteket, ezért alkalmas arra, hogy magyarázatot adjon, hogy a bursából izolált *SHH*-t nem termelő epithelium bélben történő transzplantációja hogyan befolyásolja a bélidegrendszer mintázatát, differenciálódását. A kísérlet során E9 (HH35) csirke embryoból izolált bursa Fabricii epitheliumát kollagenáz enzimmel történő kezeléssel leválasztottuk az alatta fekvő mesenchymáról és E5 (HH27) fűj utóbél mesenchymájával rekombináltuk. Az epithelium-mesenchyma összetapadását 3D kollagén gélben történő tenyésztéssel segítettük elő. 24 óra kollagén tenyésztés után a rekombinált szövetet 3E csirke embryo testüregébe transzplantáltuk. 9 nap elteltével a graftot immunhisztokémiai festésekkel vizsgáltuk és az eredményeket összehasonlítottuk a kontroll tenyészetekkel, ahol E5 fűj utóbelet rekombináltunk E5 csirke utóbél epitheliummal. QCPN immunfestés igazolja a mesenchyma fűj eredetét (45. ábra, A,E) és a 8F3 festés, hogy az epithelium, és a bélidegrendszer csirke-eredetű sejteket tartalmaz (45. ábra, B,F).





**44. ábra: A SHH és a PTC receptor expressziója a fejlődő utóbélben. A.)** *In situ* hibridizációval kimutatható az epithelium SHH transzkripciója, amely immunfluoreszcensen megjelölve **B.)** a subepithelialis mesenchyma irányába gradiens-szerű expressziós mintázatot mutat (bekeretezett, kinagyított részlet; a szaggatott vonal az epithelium basalis membránját jelöli). **C.)** E6 utóbél *in situ* hibridizációja során a PTC1 expressziója a subepithelialis mesenchymában lokalizálódik. **D-F.)** E8 utóbél PTC1 *in situ* (D, E) és p75 immunfluoreszcens (F) kettős jelölése: a p75+ ENCC és a PTC1 expresszió nem fed át. Az (E) képen körülírt terület megfeleltethető az (F) kép p75+ submucosalis ganglionjának. **G-H.)** E13 utóbél és bursa Fabricii PTC1, illetve SHH *in situ* hibridizációja: a két gén csak az utóbélben fejeződik ki. **I.)** E-cadherin az epitheliumot jelöli. **J.)** HuC/D immuncitokémia. ep, epithelium; mes, mesenchyma



**45. ábra: Az utóbél epitheliuma befolyásolja az enterális ganglionok méretét és eloszlási mintázatát.** A E5 ürj utóbél mesenchymát (HGmes) E6 csirke utóbél epitheliummal (HGep) (A-D) vagy az E9 csirke bursa Fabricii epitheliummal (BFep) (E-H) rekombináltuk. A szöveti rekombinációkat 9 napig implantáltuk az E3 embryo testüregében. A QCPN immunfestés megerősíti, hogy a mesenchyma ürjből származik (A, E), míg a 8F3 (B, F) immunfestés a hám, a bélben lévő ganglionok és az erek csirke-eredetét (B, nyílhegyek) igazolja. Amikor a bél hámot bursa hámra cseréltük, az enterális ganglionok nagyobbak és a hámmal közelebb helyezkednek el (F, G), mint a kontroll rekombinációkban (B, C). Ezt mennyiségileg megerősítettük (I-M): a musculus propria megvastagodottnak tűnik a bursa hám rekombinációkban is (H), amelyet a bél falának megnövekedett vastagsága (K) és a musculus propria (L) kvantitatív elemzés igazolja. ep, epithelium; mp, plexus myentericus; smp, plexus submucosus; SMA, alpha-simaizom aktin. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001.

A bursa epitheliumát tartalmazó szöveti rekombinációkban nagy, ektopikus helyzetű HuC/D+ ganglionok jelennek meg közel az epitheliumhoz, ami jelentősen eltér a kontroll belek idegrendszerének mintázatától (45. ábra, C, G). A 45. Ábra I képén megfigyelhető, az epithelium és a submucosalis ganglionok közötti távolság szignifikánsan kisebb a bursa epitheliumának jelenlétében ( $56\pm 25\mu\text{m}$ ), valamint a ganglionok mérete is jelentősen nagyobb ( $92\pm 41\mu\text{m}$  v.  $35\pm 17\mu\text{m}$ ; 45. ábra, J). Simaizom aktin festés különbséget mutat az izomréteg vastagságában is (45. ábra, D,I). A bursa epithelium+bél mesenchyma rekombinációkban (45. ábra, K,L) a bélfal teljes és a muscularis propria vastagsága megnőtt (45. ábra, M). Ezekben a graftokban a muscularis mucosae közvetlen az epithelium alatt helyezkedik el (45. ábra, H), sokkal közelebb, mint bél hám+bél mesenchyma rekombinálásból létrejött graftokban (45. ábra, D).

#### 4.6.3. A SHH jelátvitel gátlása intesztinális hyperganglionozishoz vezet.

A SHH expresszió hiánya a bursa epitheliumában, illetve a bélidegrendszer abnormális fejlődése a bursa epithelium+bél mesenchyma rekombinációkban azt a feltételezi, hogy a bél epitheliumból származó SHH növekedési faktor elengedhetetlenül szükséges bélidegrendszer normális fejlődéséhez. A következő kísérletben, E5 közép-, és utóbelet 3 napig tenyésztettük SHH fehérje ( $2\ \mu\text{g/ml}$ ) vagy SHH jelátvitelt gátló cyclopamine ( $2\ \mu\text{M}$ ) jelenlétében. Wholemout preparátumokat és hosszmetseteket HuC/D ellenanyaggal festettük meg (46. ábra). Kontroll E5 embryóban az enterális neuronok csak a distalis középbél szintjét érik el (Fig 3A, nyilak), de a E8-re a distalis utóbelet is kolonizálják (46. ábra, B, nyilak). Ehhez hasonlóan, amikor E5 közép+utóbelet tenyésztettünk 3 napig az utóbél a teljes ENCC kolonizációját mutatja (46. ábra, C). Ezzel ellentétben, amikor a tenyésztés során SHH fehérjét adtunk az embryonális belekhez az utóbél ganglionmentes marad (46. ábra, D, I), míg cyclopamine hozzáadásával, az utóbél teljes kolonizációja végbemegy és nagyméretű, ektopikus ganglionok kialakulása figyelhető meg. (46. ábra, E, J).

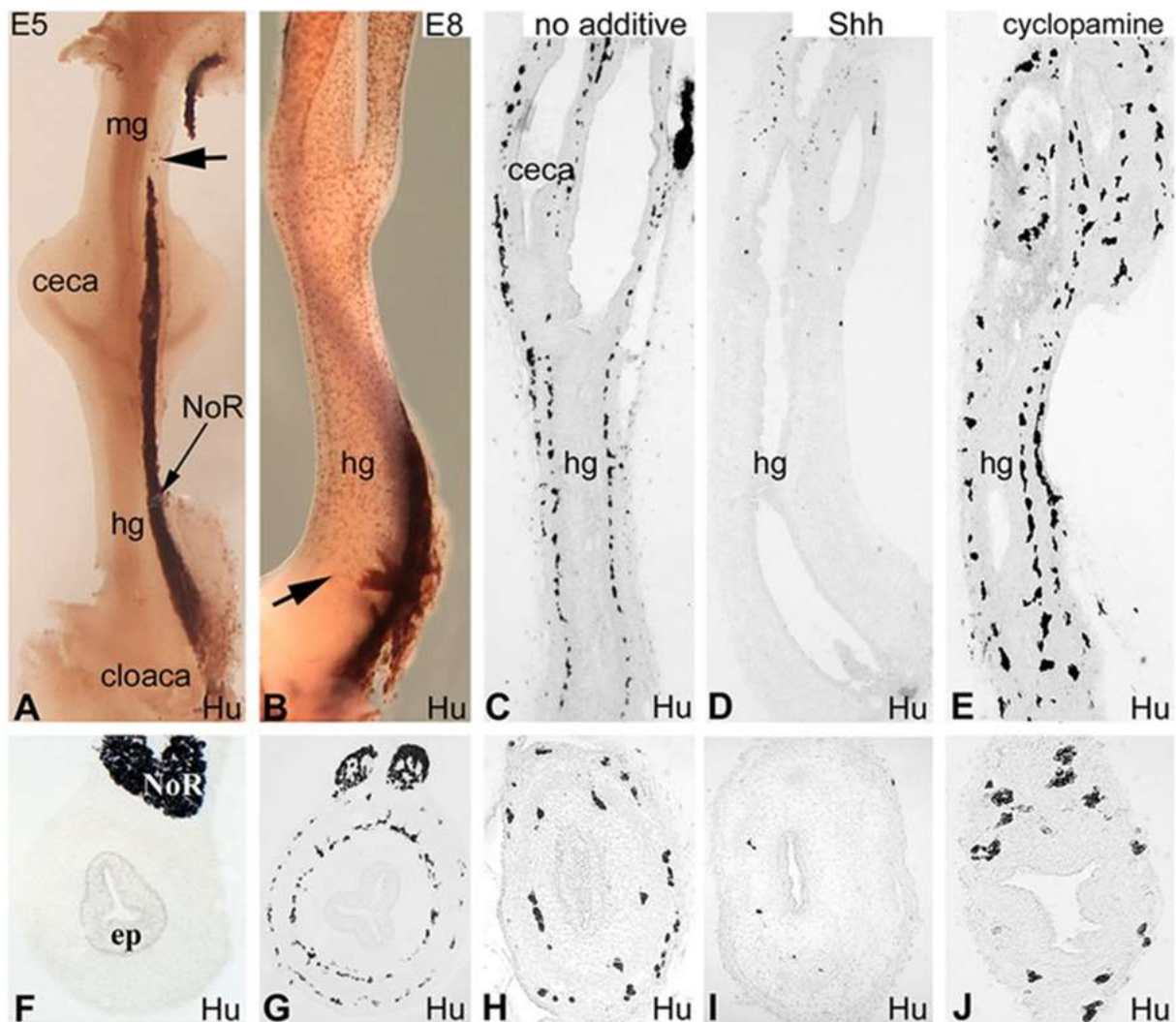
A SHH jelátvitel gátlása miatt keletkezett rendellenes ganglionok az ENCC-k proliferációs képességének megváltozása, túlélése vagy differenciálódása miatt jöhetnek



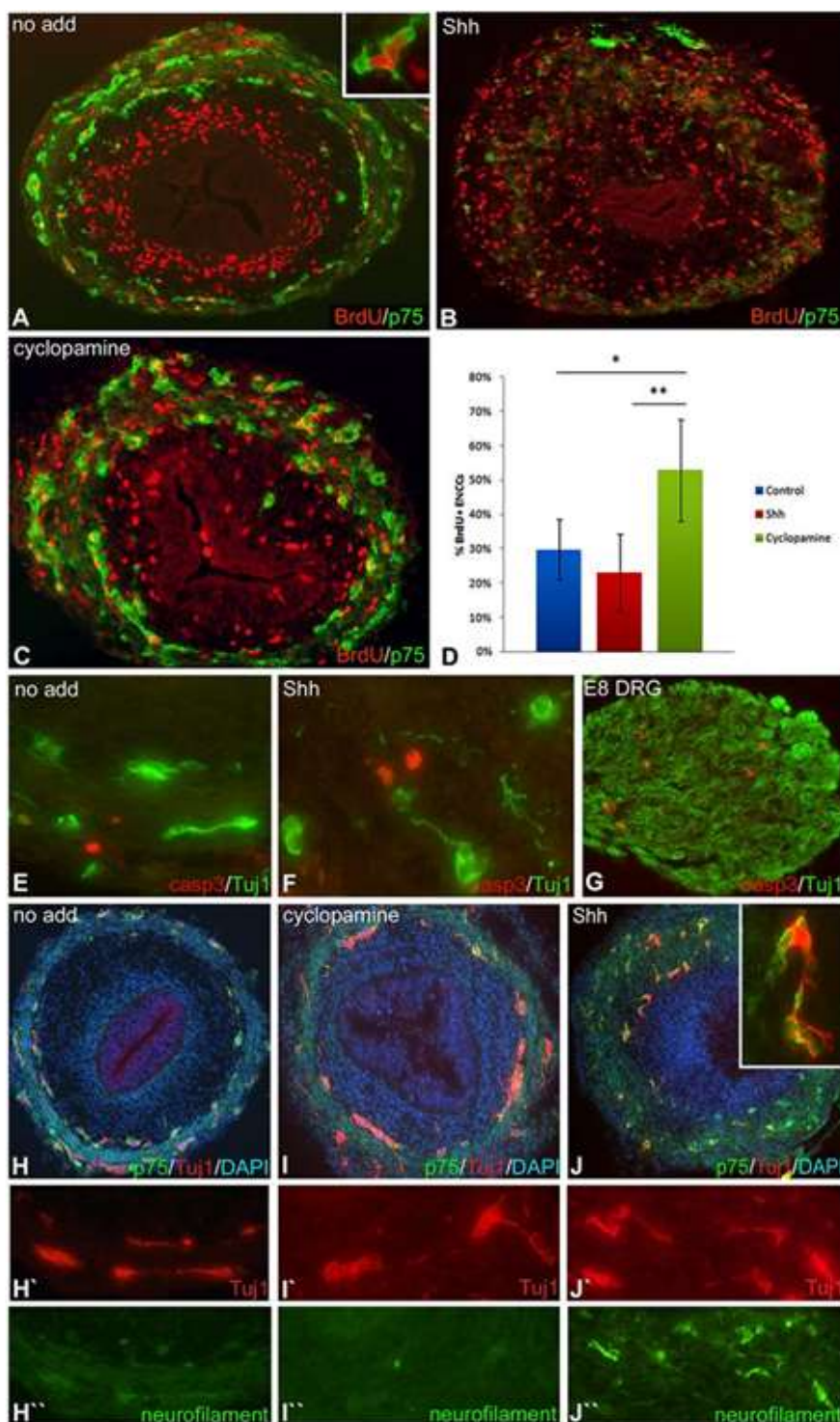
létre. A sejtosztódás mértékét a BrdU beépülés mérésével a migrációban előljáró p75+ ENCC-kben, SHH fehérje vagy cyclopamine jelenlétében vizsgáltuk. Kontrollként nem kezelt utóbeleket használtunk, itt a BrdU+ sejtek elsősorban a submucosalis mesenchymában figyelhetőek meg, ahol a p75+ ENCC-k 29,7%±8,7%-a bizonyult BrdU pozitívnak is (47. ábra, A). A SHH kezelés fokozta a mesenchymalis sejtek proliferációját (47. ábra, B), de nem volt hatással az ENCC-k osztódására (22,9%±11,4%). Ezzel szemben a cyclopamine kezelés jelentősen növelte a p75+ ENCC-k osztódását (47. ábra, C; 52,8%±14,8%) (47. ábra, D). Egyik kezelés esetében sem tapasztaltunk fokozott kaszpáz-3 aktivitást (47. ábra, E-G). Apoptózist csak néhol elszórtan a bél mesenchymájában figyeltünk meg, illetve E8 dorsalis érző ganglionban, melyről ismert, hogy apoptotikus ganglionléc sejteket tartalmaz, így pozitív kontrollként szolgált.

#### 4.6.4. A SHH elősegíti az enterális neuronok differenciálódását.

A SHH bélidegrendszer differenciálódására gyakorolt hatását beta-III-tubulint felismerő Tuj1 és neurofilamentum specifikus ellenanyagokkal kettős immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk. A Tuj1 ellenanyag korai differenciálódó neuronokat jelöl, míg a neurofilamentum expresszió a későbbi neuronokra jellemző (17., 19. ábra). Miután 5 napos embryonális beleket tenyésztettünk 3 napon keresztül cyclopaminnal a Tuj1+ sejteket egyaránt megtaláltuk az enterális plexusokban, de a neurofilamentum még nem fejeződött ki (47. ábra, H-I''). A SHH kezelt tenyészetekben a p75+/Tuj1+ neuronok csak a coecum szintjéig voltak megfigyelhetőek, a sejtek többsége neurofilamentumot is kifejez (47. ábra, 4H-J), ami azt sugallja, hogy a SHH elősegíti a legelöl haladó ENCC-k korai neurális differenciálódását és ez vezet aganlionózishoz.



**46. ábra: A SHH koncentráció kísérletes megnövelése aganglionózist okoz, míg a Hedgehog jelátvitel gátlása hyperganglionózishoz vezet. A.)** E5 stádiumban az legelől haladó ENCC-k a középbél területén járnak (nyíl), **A)** míg a 8. embryonális napra **(B)** már az utóbél distalis szakaszát is eléri (nyíl). **A,F.)** E5 bélszakaszokat 3 napig tenyésztettük: **(C,H)** nem kezelt, **(D,I)** SHH fehérje, **(E,J)** vagy cyclopamine jelenlétében. **D, I.)** SHH hozzáadása meggátolta az utóbél ENCC kolonizációját, míg a jelátvitel cyclopamine-nal történő gátlása **(E, J)** nagy és ektopikus ganglionok megjelenéséhez vezetett. Ep, epithelium; hg, utóbél; mg, középbél; NoR, Remak-ganglion; mp, plexus myentericus.



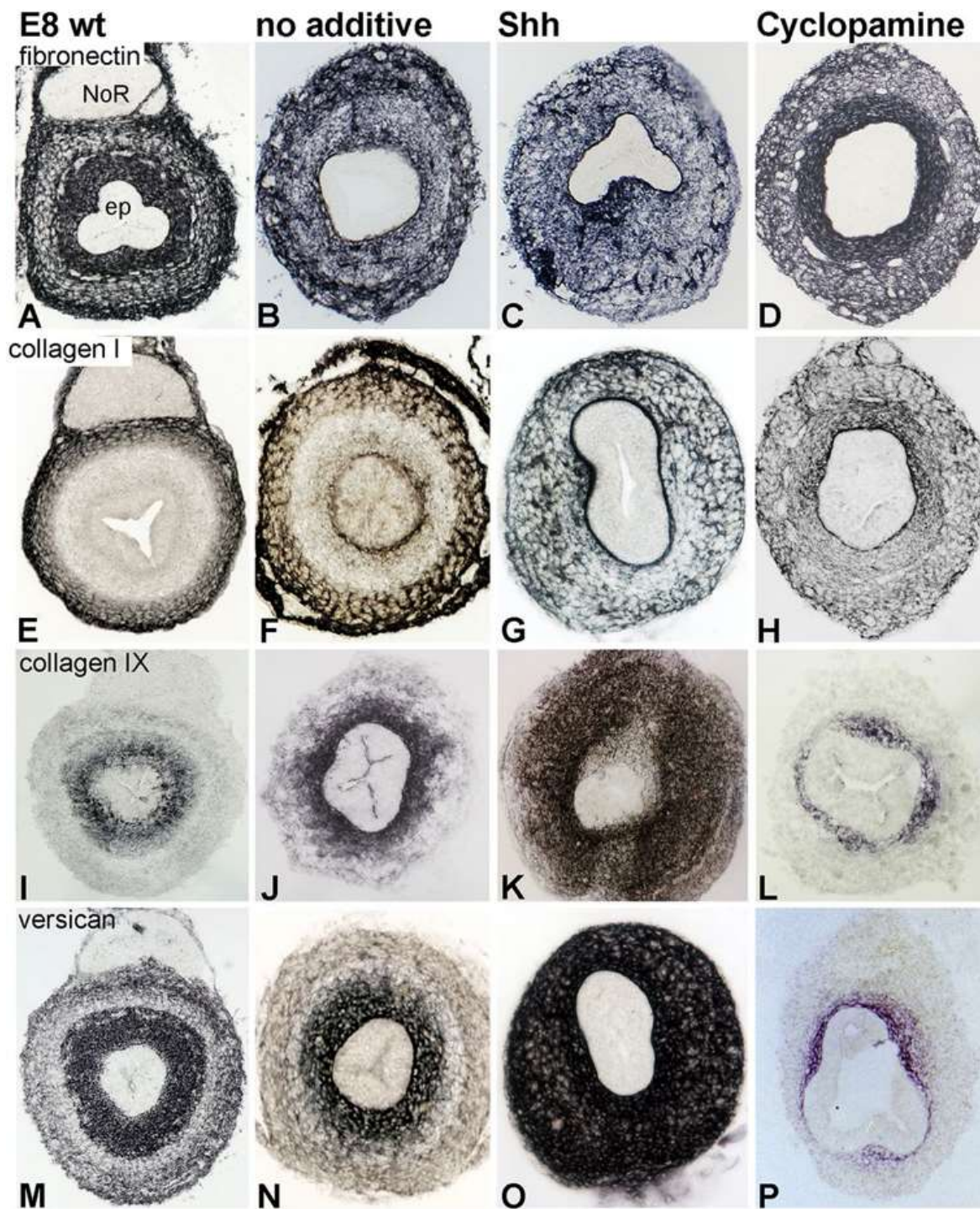
**47. ábra: A SHH és a cyclopamine kezelés hatása az ENCC-k proliferációjára és differenciálódására.**

**A.)** E8 nem kezelt, **(B)** E5+3 napos SHH kezelt és **(C)** E5+3 napos cyclopamine kezelt embrionális bél keresztmetszete. Az osztódó sejtek kimutatására BrdU jelölést (piros) alkalmaztunk, míg a ganglionléc-eredetű sejteket p75-el (zöld) jelöltük. **D.)** A kezeléseik során megfigyelt kettősen pozitív sejtek számadatai oszlopdiaagramon. **E,F.)** Apoptózis kimutatására a metszeteket aktivált kaspáz 3-al és Tuj1-el jelöltük. **G.)** A pozitív kontrollként szolgáló hátsó gyöker ganglionban (DRG) jelentős apoptotikus aktivitás látható. Tuj1 és neurofilamentum festéssel a korai, illetve a késői neuronális differenciálódást vizsgáltuk. **(H'-J')** Tuj1+ neuronok az összes kezelt csoportban megjelentek, **(H''-J'')** neurofilamentum pozitívítás viszont csak a SHH kezelést követően láttunk. \*P<0.002, \*\*P<0.0004.

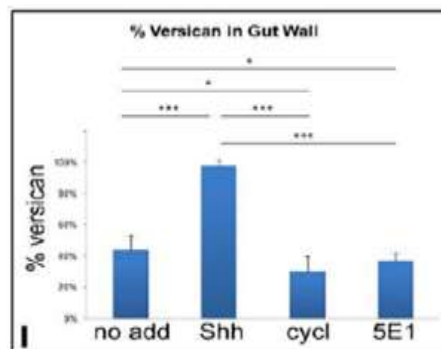
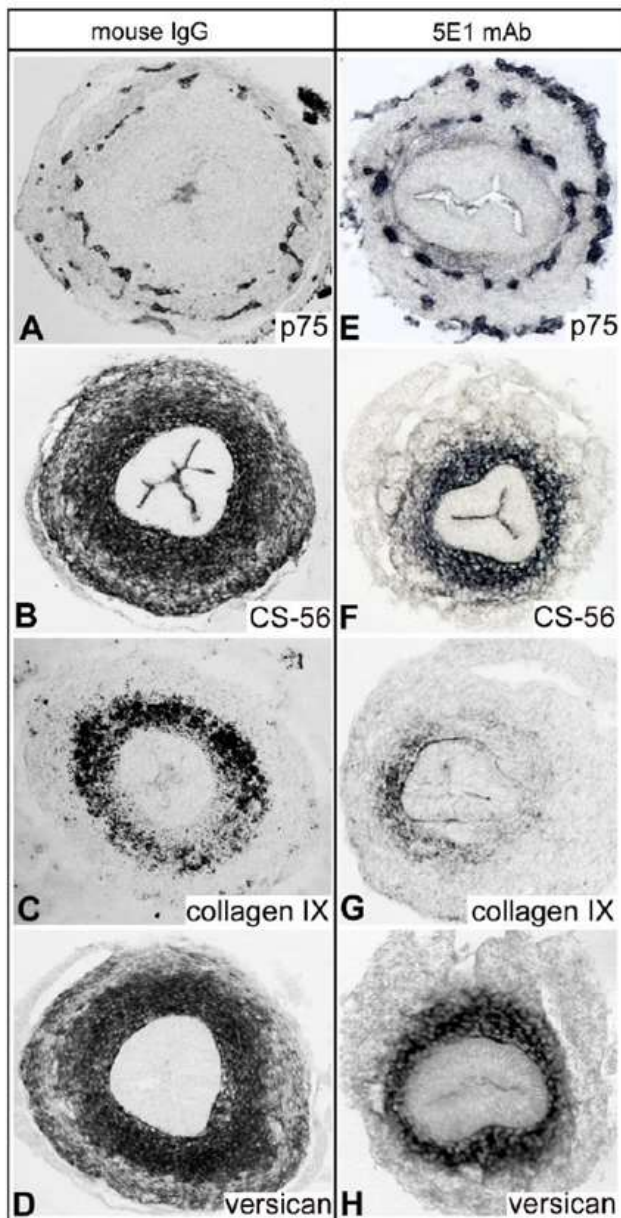
#### 4.6.5. A SHH az extracelluláris mátrix expressziós mintázatát szabályozza a fejlődő bélben.

Mivel az SHH receptor nem expresszálódik az ENCC-ken, felmerül az a lehetőség, hogy a bélidegrendszer fejlődésére gyakorolt hatás indirekt módon a mikrokörnyezet megváltoztatásával történik. A SHH extracelluláris mátrix (ECM) komponenseinek eloszlására gyakorolt hatását immuncitokémiai módszerekkel vizsgáltuk: kollagén I, III, VI, IX, XVIII, laminin, fibronectin, versican, tenascin, agrin, heparán-szulfát- és kondroitin-szulfát proteoglikán ellenanyagokkal végeztünk immunfestést. A fibronectin egyenletesen expresszálódik a bél mesenchymájában, intenzív fibrilláris festést mutatva a belső mesenchymális rétegben. SHH és cyclopamine kezelés nem változtatta meg lényegesen a fibronectin eloszlási mintázatát (48. ábra, A-D). Ehhez hasonlóan a kollagén III, VI és XVIII, laminin, agrin és heparán-szulfát expressziója nem változott számottevően (adatokat nem mutatjuk). E8 utóbélben normál esetben a kollagén I a külső mesenchymális rétegben fejeződik ki (48. ábra, E,F). Ezzel szemben, ha E5 utóbelet 3 napig SHH vagy cyclopamine jelenlétében tenyésztünk, megváltozott mintázatot tapasztalunk, a kollagén I a bél belső mesenchymarétegre korlátozódik (48. ábra, G). A legjelentősebb ECM-ban történő változást a kondroitin-szulfát proteoglikán molekulák expressziója mutatta, amelyekről ismert, hogy gátló faktorai a ganglionléc sejtek vándorlásának (Ring és mtsai., 1996; Dutt és mtsai., 2006). A CS-56 (a kondroitin-szulfát proteoglikánok glükózaminoglikán részét jelöli), kollagén IX és a különböző versican izoformák (Landolt és mtsai. 1995; Zanin és mtsai. 1999; Dutt és mtsai., 2006; 2011) közvetlen a hám alatt expresszálódnak. SHH kezelés hatására valamennyi CSPG típusú molekula expressziója kiterjed a teljes mesenchymára, míg a cyclopamine kezelés kifejezetten csökkentette a kollagén IX és a versican expressziós területét a subepitheliális mesenchymában (48. ábra, I-P). Az SHH CSPG molekulák expresszójára kifejtett hatását funkció-blokkoló ellenanyaggal (klón: 5E1, Ericson és mtsai., 1996) is megnéztük. Az 5E1 kezelést követően a p75 expressziót mutató ganglionok túlméretezettek és ektopikusan jelennek meg a bélben, akárcsak a cyclopamine kezelés esetén, ami együtt járt a CS-56, a kollagén IX. és a versican (V2 izoforma) expressziójának a belső mesenchyma szintjére történő csökkenésével (49. ábra). Kvantitatív RT-PCR módszerrel igazoltuk, hogy E5 tenyésztett embryonális belekben a SHH csökkentette a mesenchymális *GDNF* expressziót, míg az *EDN3* expresszió változatlan maradt (50. ábra).

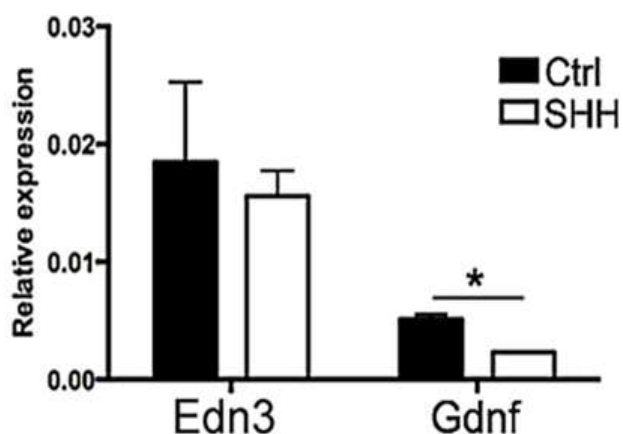




**48. ábra:** A SHH expresszió megváltozása módosítja a bél extracelluláris mátrix mintázatát. (A, E, I, M) E8 csirke embryo utóbélben számos mátrix fehérje expressziós mintázatát vizsgáltuk, és hasonlítottuk össze E5 utóbél 3 napig különböző kísérleti összeállításokban tenyésztetivel: (B, F, J, N) nem kezelt, (C, G, K, O) SHH fehérje (D, H, L, P) és cyclopamine kezelt. (A-D) A fibronectin, (E-H) a kollagén I, (I-L) a kollagén IX és (M-P) a versican V0/V2 komparatív expressziója az utóbél középső szakaszának keresztmetszeti ábráin. ep, epithelium; NoR, Remak-ganglion.



**49. ábra: Az SHH funkciógátló ellenanyag a cyclopamine-hoz hasonló hatást mutat.** Az E5 csirke utóbél szakaszokat kollagén gélben tenyésztettük 3 napig. A p75 (A, E), CS-56 (B, F), a IX. Kollagén (C, G) és a versican V2 (D, H) expressziója szignifikánsan megváltozik a SHH funkciógátló 5E1 nevű monoklonális ellenanyag jelenlétében (E,H). A versican expressziós domén mennyiségi mérése megerősíti az immunhisztokémiai eredményeket (I).

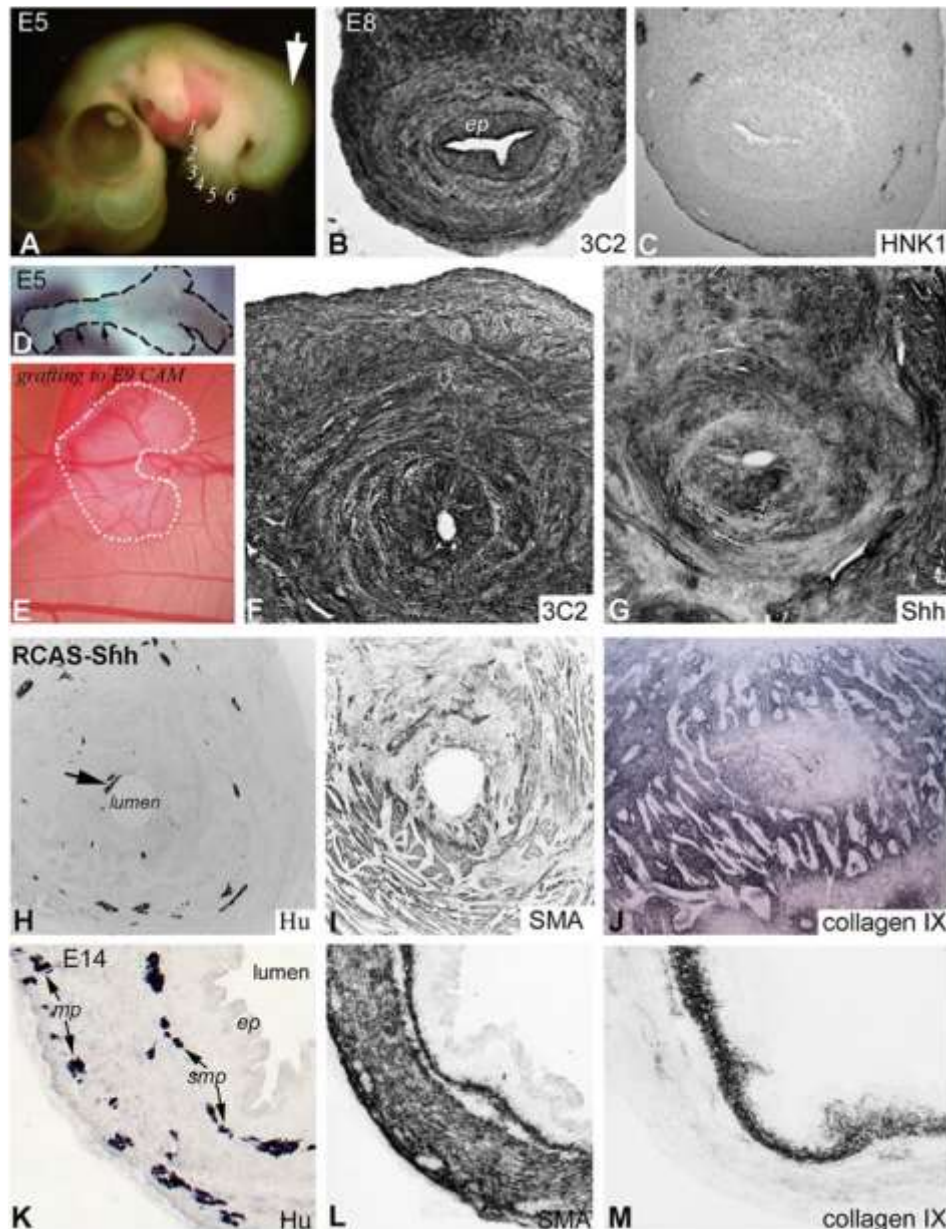


**50. ábra: A SHH túlermelése csökkenti a GDNF expressziós szintjét.** Az EDN3 és GDNF gének relatív expresszióját 3 napig tenyésztett E5 bélben, hozzáadott faktor nélkül (Ctrl) vagy 2 µg /ml SHH rekombináns fehérje jelenlétében, qRT-PCR-rel határoztuk meg. Míg az EDN3 expresszióját nem befolyásolta, a GDNF expressziója SHH jelenlétében jelentősen csökkent. \* P <0,01.

#### 4.6.6. A SHH retrovírus mediált funkciónyerés aganglionózist okoz.

Az SHH hatását a bélidegrendszer fejlődésére *in vivo* rendszerben is megvizsgáltuk, ahol csirke SHH-t expresszáló replikációra képes retrovírus (RCAS) felhasználásával fejztettük ki a SHH-t. Korábbi tapasztalatainkat felhasználva (Goldstein és mtasi, 2005) az RCAS vírust E2 embryo leendő utóbél mesodermájába injektáltuk. Az RCAS-SHH fertőzött embryok morfológiája markáns különbségeket mutatott az embryonális fejlődés 5. napjára, amikor a hátsó végtagon extra ujjak jelentek meg, ahogy ezt már korábban Riddle és munkatársai is megfigyelték (Riddle és mtasi., 1993). Az embryonális fejlődés 8. napjára az RCAS P19 gag fehérjéjét felismerő 3C2 ellenanyag extenzív virális expressziót mutat a bélfal szintjén. Fontos megjegyezni, hogy a HNK-1 pozitív ENCC-k hiányoznak az utóbél mesenchymából, ahol a SHH túlexpressziója figyelhető meg, amely alátámasztja a SHH által indukált aganglionózist. Mivel az RCAS-SHH fertőzött embryok 80%-a az embryonális fejlődés 8. napjára elpusztult, 5 napos embryonális középbél/utóbél szakaszokat injektáltunk RCAS-SHH-al, amelyeket chorioallantois membránon tovább tenyésztettünk 9 napig. A sikeres virális replikációt a 3C2 immunfestés bizonyította, az erőteljes SHH expressziót pedig az SHH specifikus ellenanyaggal lehetett kimutatni. A SHH-túlexpressziót mutató utóbél ENCC általi kolonizációja jelentősen lecsökkent, súlyos hypoganglionózis volt megfigyelhető a proximális utóbél szintjén, míg aganglionózis a distalis utóbél szintjén. Ezen felül, a ganglionmentes szegmenshez képest proximálisan elhelyezkedő enterikus ganglionok kisméretűek, szórványosan és ektopikusan jelentkeznek, nem mutatják a kontroll bél esetében megfigyelt mintázatot, a jól elkülönült myentericus és submucosalis plexusok létrejötté elmarad. Ugyanakkor a HU+ enterális neuronok közvetlenül az epithelium mellett figyelhetőek meg, ahol normál esetben nem fordulnak elő. A simaizom fejlődés ugyanúgy zavart szenved az ebben a stádiumban megfigyelhető normál, három izomrétegből (muscularis mucoasae, belső körkörös és külső longitudinális) álló mintázathoz képest. Érdekes módon a SHH túlexpressziója esetén a kollagén IX expressziója drámaian megnövekszik; a versican expressziója hasonló változásokat mutatott (51. ábra).

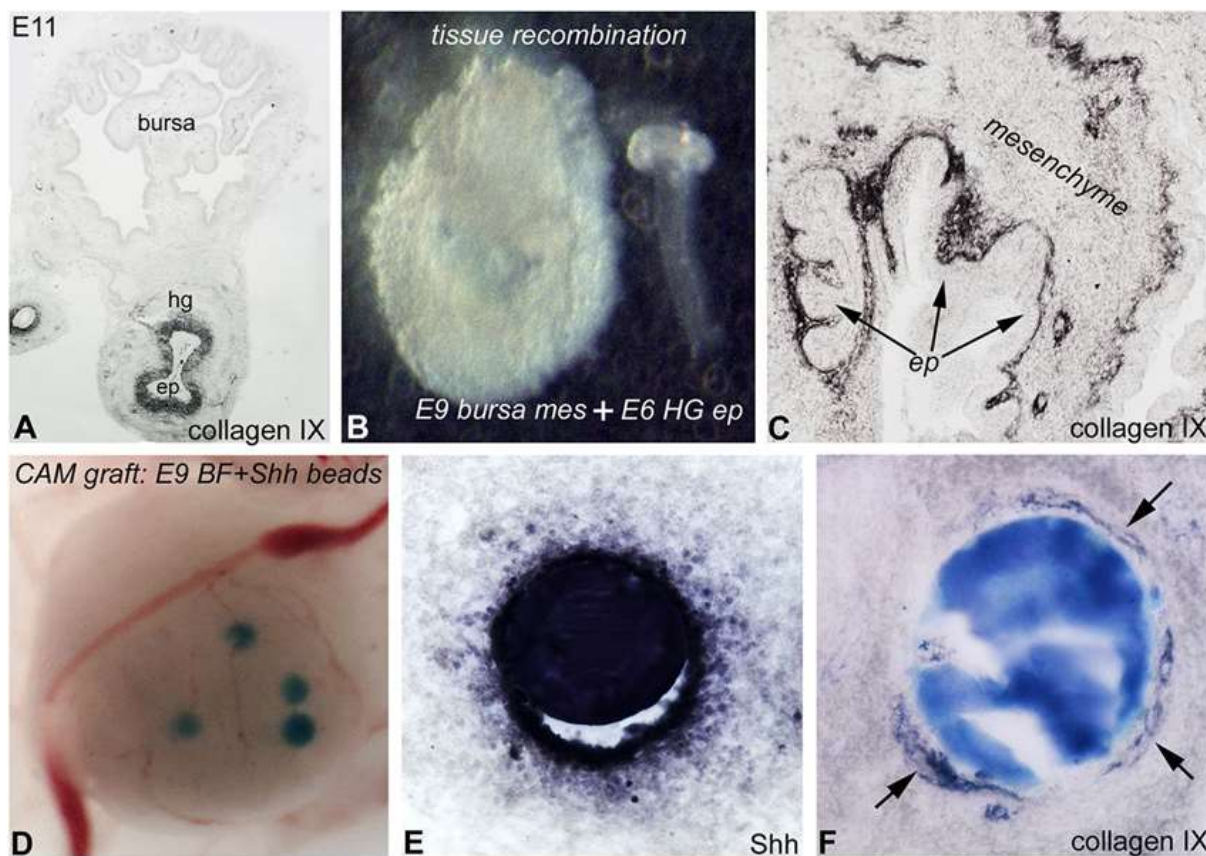




**51. ábra: A SHH-RCAS és cyclopamine kezelés *in vivo* hatása a bélidegrendszer fejlődésére.** **(A)** Az RCAS-SHH E2 csirke embryo utóbélének mezoderájába injektálását követő 5. embryonális napra a hátsó végtagokon polidaktília (számfeletti ujjak) és farokbimbó malformáció (nyíl) alakult ki. **(B)** A 2 napon injektált embryo E8 korára az RCAS expresszió az utóbél teljes területére kiterjedt **(C)**, ami a bélidegrendszer hypoganglionózisával társult aganglionózissal jár együtt. **(D)** E5 csirke embryóból izolált vastagbél-coecum-distális vékonybél részletének makroszkópos képe mikroinjektálás után. A nyilak az injektálás helyét mutatják, ami a 0,1%-os Fast Green festék kékeszöld színnel jelölt. Az izolált béldarabot 3-3 helyen (proximálisan, középen és distalisan) injektáltuk. **(E)** A chorioallantois membrán-(CAM)-tenyésztés makroszkópos képe. **(F)** 9 nap CAM tenyésztést követően az RCAS és a **(G)** SHH expresszió az utóbél teljes szélességére kiterjedt. **(H)** A vírusfertőzés következtében a 14 napos utóbélben hypoganglionózis és ektopikusan elhelyezkedő ENCC-k, valamint **(I)** megváltozott simaizom fejlődés figyelhető meg. **(J)** E14 cyclopamine kezelt vastagbél keresztmetszetén a plexus submucosus hyperganglionózisa (nyíl), valamint **(K)** megvastagodott simaizomréteg ábrázolódik. Ep, epithelium; pm, plexus myentericus; psm, plexus submucosus

4.6.7. A SHH mesenchymális kollagén IX expressziót indukál.

Normál embryóban a közép-, és az utóbél mesenchymája kollagén IX-et expresszál, viszont a bursa Fabricii mesenchymája kollagén IX-et nem tartalmaz (52. ábra, A). Amikor SHH expressziót mutató E6 utóbél epitheliuma E9 bursa mesenchymával rekombináltunk és 3 napos embryo testüregében tenyésztettük az utóbél epitheliuma kollagén IX expressziót indukált a bursa mesenchymában (52. ábra, B, C). Hogy valóban a SHH felelős a kollagén IX expressziójának indukációjáért, SHH proteinnel kezelt Affi-gel microgyöngyöket implantáltuk a E9 bursa epithelio-mesenchymális kezdeményébe (52. ábra, D) és chorioallantois membránon tenyésztettük. A microgyöngyök mesenchymalis környezete erős SHH immunpozitivitást mutatott (52. ábra, E), amihez a környező mesenchyma sejtekben kollagén IX immunreaktivitás társult (52. ábra, F).



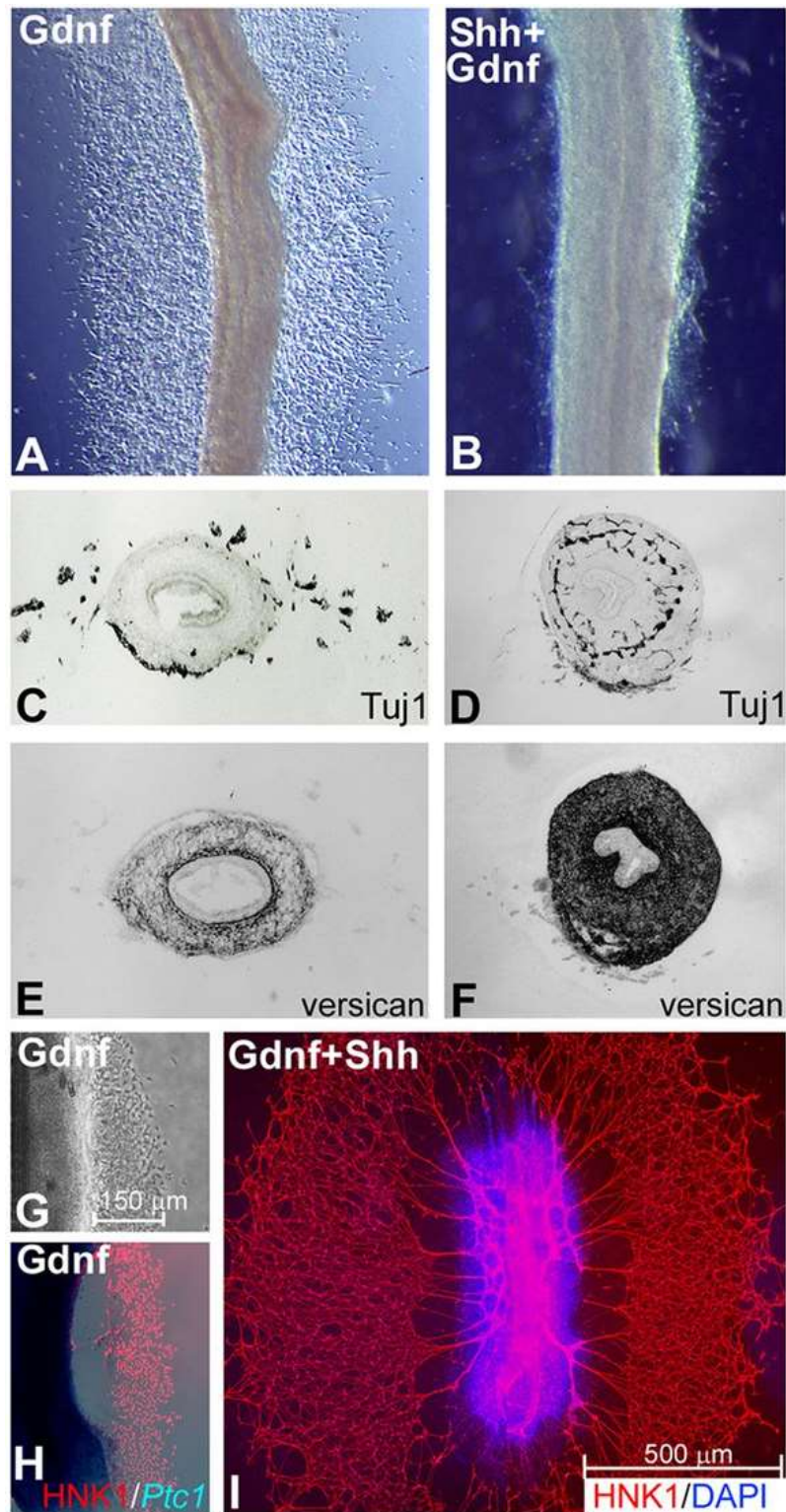
**52. ábra: Az SHH indukálja a kollagén IX mesenchymális expresszióját.** A.) A bursa Fabricii mesenchymája kollagén IX molekulát nem fejezi ki. B.) Az E6 csirke utóbél epitheliumát E9 bursa mesenchymával rekombináltunk és 10 napig E3 csirke testüregben tenyésztettük. C.) Az utóbél epitheliuma ektopikus kollagén IX expressziót indukált a környező bursa Fabrici mesenchymájában. D.) A SHH növekedési faktorról átítatott microgyöngyöket E9 csirke bursa telepébe ültettük és 7 napig CAM-on tenyésztettük. E.) A SHH fehérje expressziója a microgyöngyön és környékén jól kivehető, ami a kollagén IX mesenchymájával társul (F, nyilak). BF, bursa Fabrici; CAM, chorioallantois membrán; ep, epithelium; hg, utóbél.

#### 4.6.8. A SHH közvetett módon gátolja az ENCC-k migrációját.

Az ENCC-k nem expresszálnak *PTC1* receptort, ami arra utal, hogy a SHH nem közvetlen módon hat a bélidegrendszer fejlődésre, hanem feltehetőleg az extracelluláris mikrokörnyezet megváltoztatásával, indirekt módon okoz aganglionózist. A SHH molekula ENCC migrációra gyakorolt közvetett vagy közvetlen befolyásának vizsgálatára E8 középbeleket GDNF (10 ng/ml), valamint GDNF és SHH (2 µg/ml) kettős kezeléssel 48 órán át tenyésztettünk (53. ábra). A korábban ismert adatok alapján, a GDNF markáns ENCC migrációhoz vezetett (53. ábra, A), míg a hozzáadott SHH gátolta a GDNF által kiváltott ganglionléc eredetű sejtek migrációját. Fontos azonban megjegyezni, hogy a migráció gátlásával egyidőben, a versican típusú ECM fehérje expressziója jelentősen megnőtt a SHH jelenlétében, a subepitheliális lokalizációval ellentétben a teljes bél mesenchymára kiterjedő mintázatot mutatott (53. ábra, E,F).

A SHH ENCC migrációra gyakorolt direkt és indirekt hatásainak elkülönítésére, E6 középbelet GDNF jelenlétében, 24 órán át fibronectin kezelt felszínen tenyésztettünk (53. ábra, G). A *PTC1* gén *in situ* hibridizációja igazolja, hogy a PTC-1 kifejeződik a bél mesenchymában, a HNK1 pozitív ganglionléc eredetű sejtekben azonban nem expresszálódik (53. ábra, H). 24 órás GDNF környezetben történő tenyésztést követően, rekombináns SHH proteint (2 µg/ml) adtunk a médiumhoz, amelyet további 48 órás tenyésztés követett. Ahogy azt a 53. ábra, I is mutatja, az erőteljes GDNF-indukált ENCC migráció folytatódott a SHH jelenlétében is; a sejtek 500 µm távolságra is kivándoroltak (n=10). Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a bél mesenchyma hiányában a SHH-nak nincs közvetlen gátló hatása az ENCC-k migrációjára.

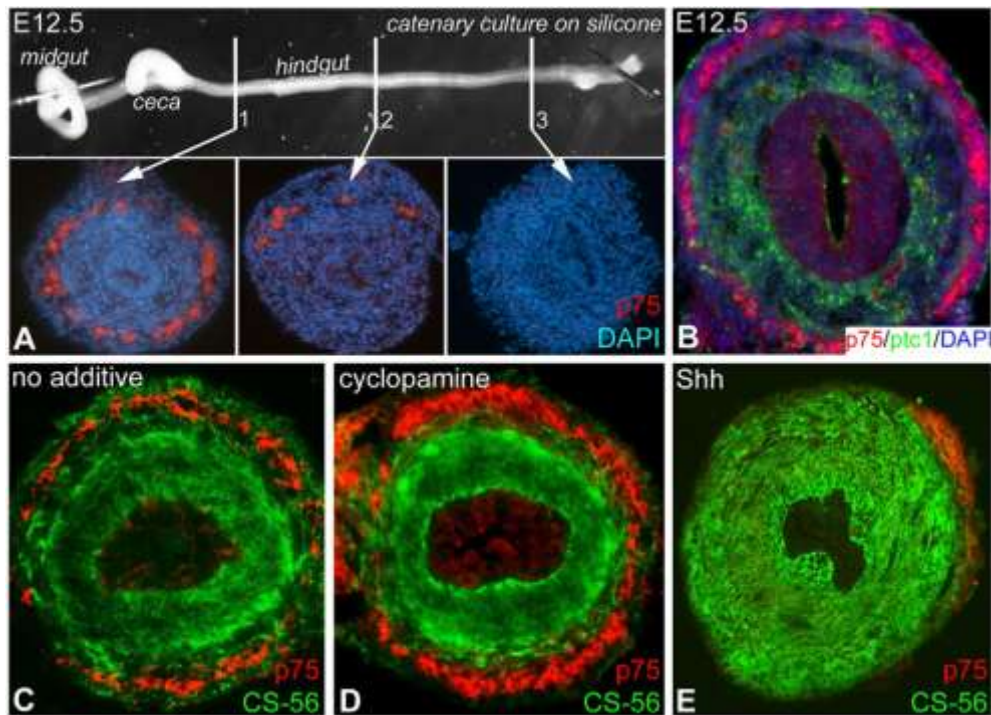




**53. ábra:** SHH nem közvetlenül hat az ENCC-k vándorlására. E8 középbelet GDNF (A, C, E) vagy GDNF+SHH (B, D, F) jelenlétében kollagén gélben 48 órán át tenyésztjük. A GDNF indukálja az ENCC-k kivándorlását az embryonális bélből (A, C), míg a SHH hozzáadása gátolja ezt a chemoattraktáns hatást (B, D). E,F.) SHH jelenlétében a versican expresszió szignifikáns növekedését mutatott. G,H.) A *PTC1* expresszió *in situ* hibridizációs jelölése nem mutat expressziót a 24 órás GDNF indukált ENCC-ben. I.) A SHH hozzáadása és további 24 tenyésztése szerint az SHH nem gátolja a GDNF indukált ENCC-k folyamatos vándorlását.

#### 4.6.9. A SHH gátolja az egér bélidegrendszer fejlődését.

Egér embryóban az embryonális fejlődés 12.5 napján a vándorló ENCC-k az utóbél középső szakaszán járnak (54. ábra, A). Hasonlóan a csirke embryohoz, ebben a stádiumban végzett p75 és PTC-1 kettős immunfluoreszcens festés szerint a PTC-1 expresszió a belső mesenchyma területére korlátozódott, a p75+ ENCC-k felszínén nem mutatható ki (54. ábra, B). Abban az esetben, amikor a E12.5 utóbél tenyésztés csak tiszta médiumban (54. ábra, C) vagy cyclopamine jelenlétében történt (54. ábra, D) az ENCC-k utóbél kolonizációja végbement, a migráló sejtek a distalis utóbél szintjét is benépesítették. Cyclopamine kezelt belek esetén a CSPG-t jelölő CS-56 expressziója jelentősen lecsökken és a belső mesenchyma területére koncentrálnak (54. ábra, C,D). A rekombináns SHH fehérje hozzáadásával a distalis utóbélben aganglionózis figyelhető meg, ahol a madarar embryóban észlelt eredményekhez hasonlóan, a CS-56 molekula az egész mesenchymára kiterjedő expressziót mutatott (54. ábra, E).

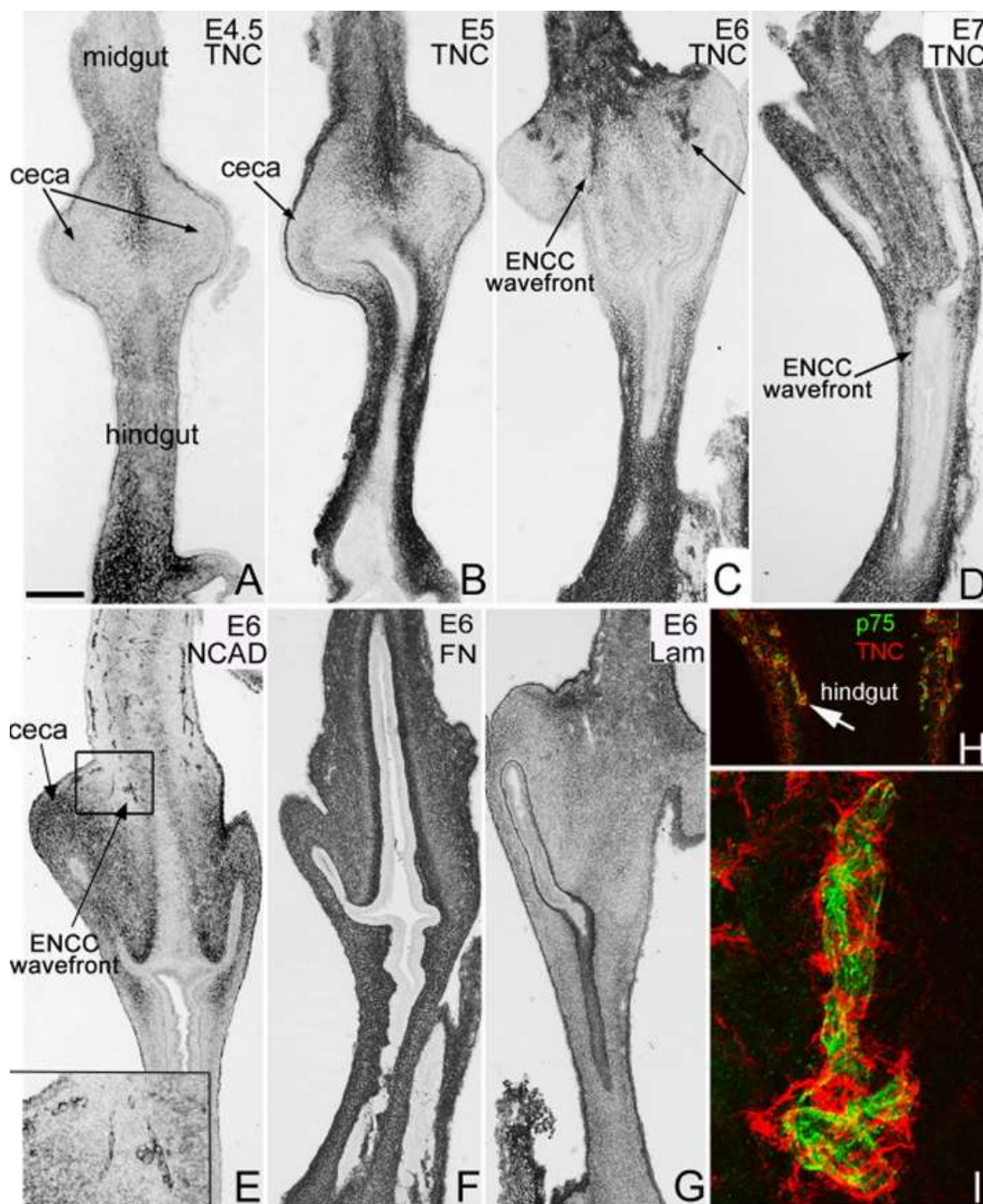


**54. ábra: SHH jelátvitel hatása az egér bélidegrendszerének fejlődésére. A.) E12.5 egér embryóban a vándorló p75+ ENCC-k az utóbél középső szakaszánál járnak (2. metszet), a distalis utóbél ebben a stádiumban még ganglionmentes (3. metszet). B.) A p75+ és a PTC1 expresszió nem mutat átfedést. 48h elteltével az ENCC-k eléri a distalis utóbelet. C-E.) A nem kezelt, cyclopamin és SHH kezelt utóbél kollagén gélben tenyésztett bél összehasonlító CS-56 expressziós mintázata. D.) A cyclopamine nem gátolta az enterális ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását; CS-56 expressziója lecsökkent, a mesenchyma belső területére koncentrálnak. A SHH jelenléte distalis aganglionózishoz vezetett, ami együtt jár a mesenchyma diffúz és intenzív CS-56 expressziójával.**

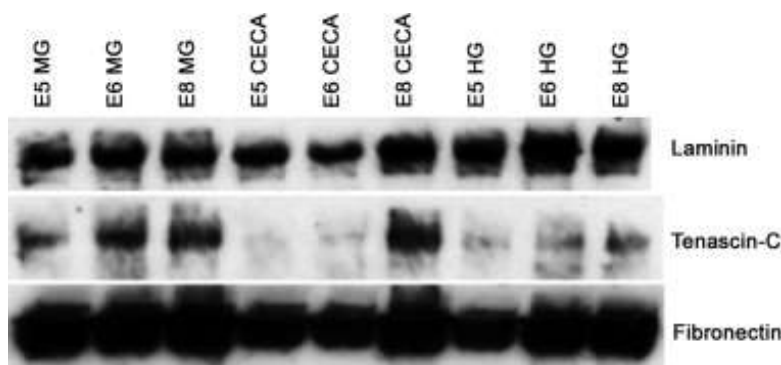
#### 4.7. Tenascin-C szerepe a bélidegrendszer fejlődésében

Miután kimutattuk, hogy normál embryóban a ganglionlécből származó ENCC-k bélben történő migrációs irányának és helyének kijelöléséhez egyfajta vezérfonalként működik a bélfal kapillárisainak laminin+ basalis membránja, a következőkben a részletesebben vizsgáltuk az extracelluláris mátrix változását a bélidegrendszer fejlődése során. Sorozatmetszeteken végzett immuncitokémia festésekkel megfigyeltük, hogy az E4.5-E5 időszakban, amikor az ENCC sejtek a distalis középbélben vándorolnak, a tenascin-C jelen van a közép, és utóbél mesenchymájában, de teljesen hiányzik coecum mesenchymájából (55. ábra, A,B). A következő embryonális napon (E6) az N-cadherint kifejező vándorló ENCC-k eléri a coecum tenascin-mentes területét, ahol a tenascin-C expresszió foltokban lokalizáva figyelhető meg. Az N-cadherin ebben a fejlődési állapotban a coecum mesenchymájában is jól kivehető, akár csak a HNK-1 és p75 (14. ábra). A tenascin-C expressziójával ellentétben, fibronectin és laminin egységesen termelődik az embryonális bél valamennyi szakaszában (55. ábra, F,G). Mivel a coecumban található tenascin-C immunreaktivitás képe és a migráló ENCC eloszlás között nagy hasonlóságot találtunk, kettős-immunfloreszcens festést alkalmaztunk tenascin-C és p75 ellenanyagokkal, hogy meghatározzuk a tenascin-C fehérje expressziós mintázatát az ENCC-k vándorlása idején. Kimutattuk, hogy amikor az ENCC sejtek a coecumot és a proximális utóbelet kolonizálják, a migráló ENCC sejtek környezetét intenzív tenascin-C expresszió jellemzi (55. ábra, H, I). Az E5, E6 és E8 stádiumokból izolált utóbél Western-blot analízisével kimutattuk, hogy a laminin és fibronectin egyformán erősen expresszálódik a középbélben, coecumban és utóbélben. Ezzel ellentétben, az E5 stádiumban a tenascin-C hiányzik a coecumból, nagyon kis mértékben van jelen az E6 stádiumban (56. ábra), mely alátámasztja az immunhisztokémiai eredményeket. Az umbilicus utáni bélszakaszok minden szegmensén az ENS fejlődéssel párhuzamosan a tenascin-C expresszió is felerősödik.





**55. ábra: A tenascin-C (TNC) expresszió kolokalizál a legelől vándorló ENCC-vel.** A tenascin-C dinamikus expressziója látható a E4.5 (A), E5 (B), E6 (C) és E7 (D) embryo posztumblikális bélszakaszának hosszmetsetein. A tenascin-C mesenchymalis kifejeződése E4.5-5 stádium között a coecumtól proximálisan és distálisan figyelehető meg, a coecalis régióban hiányzik (A és B nyíl), itt az ENCC-k előrehaladtával párhuzamosan, E6 (C, nyíl) és E7 (D, nyíl) stádiumokban jelenik meg. E6 bél hosszmetsetének N-cadherin immunfestése alapján a legelől vándorló ENCC-k ebben a stádiumban a coecum magasságában járnak (E), a bekeretezett terület látható kinagyítva). E6 bélfalban a fibronectin (F) és a laminin (G) egyaránt expresszálódik. E7 utóbél proximális szakaszának hosszmetsetéről készített konfokális képen a legelől vándorló p75+ ENCC-k (zöld) körül kifejezett tenascin-C festődés (piros) látható (H), a nyíl az I ábrán kinagyítva látható területet jelöli).



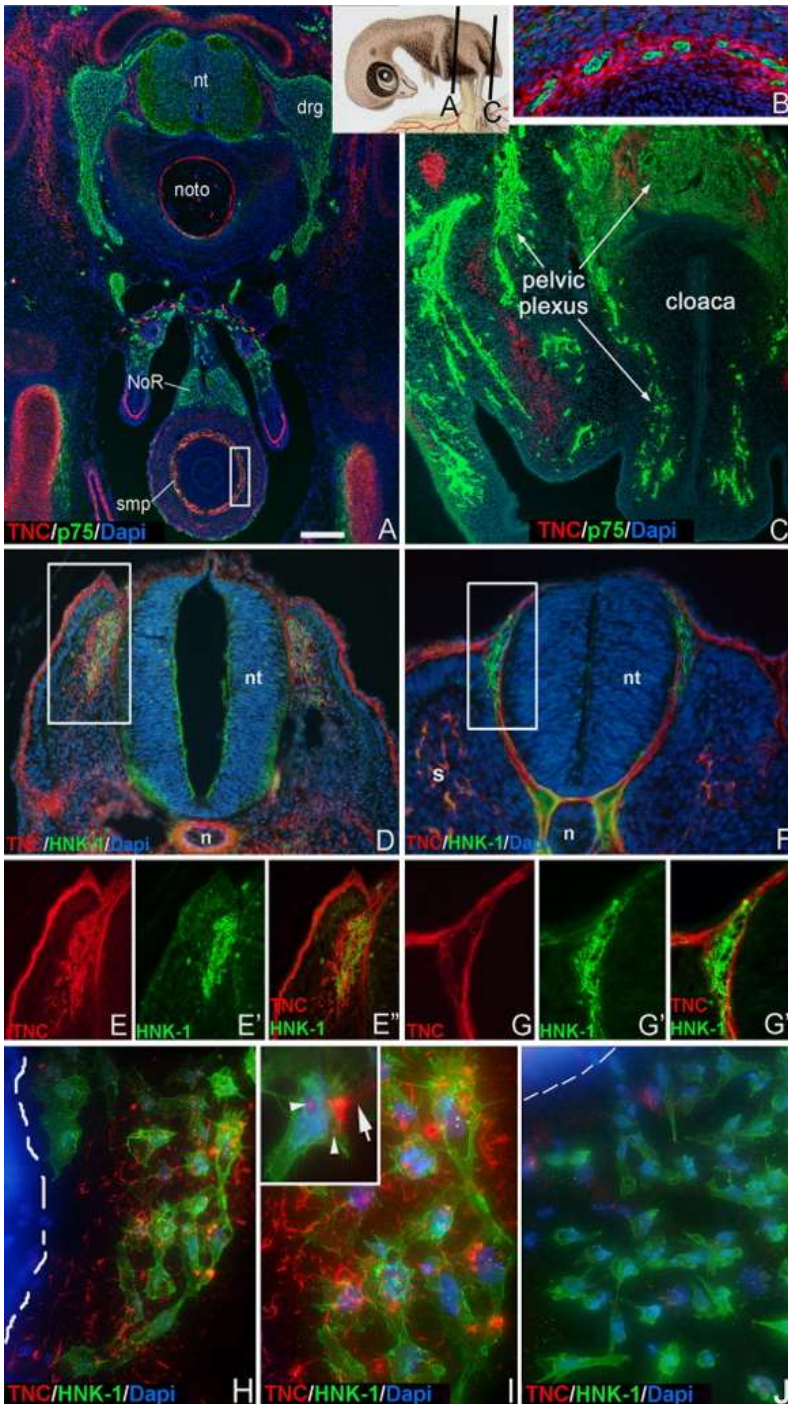
**56. ábra: A tenascin-C fehérje dinamikus expressziót mutat a distális bélszakasz fejlődése során.** A laminin, a tenascin-C és a fibronectin expressziós szintjének meghatározása immunoblot analízissel E5, E6 és E8 embryok posztumblikális középbélnek, coecalis régiójának és utóbélnek szöveti lízátumából. mg, középbél; hg, utóbél.

#### 4.7.1. A vagus velőcső régióból származó ganglionléc-eredetű sejtek tenascin-C-t fejeznek ki.

E8 stádiumú csirke embryok keresztmetszeteinek tenascin-C immunfestése szerint a plexus myentericus és submucosalis (57. ábra, A,B) erős tenascin-C immunreaktivitást mutat. Ezzel ellentétben, sacralis régióból származó ganglionléc eredetű struktúrák, a Remak-ganglion és plexus pelvicus nem fejezik ki ezt a típusú ECM molekulát (57. ábra, C). Ismert tény, hogy a HH13 és HH21 fejlődési stádiumok között történik a vagus, illetve a sacralis eredetű ganglionléc sejtek ventrális irányú migrációja (Kuo és Erickson, 2011). A velőcsőből készült fagyasztott metszeteken, valamint vagus és sacralis régióból izolált velőcső tenyészeteken kimutattuk, hogy csak a vagus területről kilépő ganglionléc sejtek képesek tenascin-C termelésre, a sacralisból jövő sejtek nem expresszálják ezt a molekulát (57. ábra, D-J).

#### 4.7.2. ENCC sejtek meghatározzák a tenascin-C expressziós mintázatát.

A vagus eredetű ENCC sejtek körüli tenascin-C immunreaktivitás jelenlétére alapozva feltételeztük, hogy az ENCC-k szükségesek a tenascin-C expresszióhoz. Ennek igazolására, E5 stádiumú ganglionmentes vastagbél középbéllel és coecummal együtt vagy anélkül (58. ábra, A), E9 embryo chorioallantois membránján (CAM) 8 napig tenyésztettük. A középbél is tartalmazó CAM graftokat teljesen kolonizálódttak a Tuj1+ enterális neuronok (58. ábra, B), és erős tenascin-C expressziót mutattak végig a bél mesenchymájában (58. ábra, C). Ezzel ellentétben, coecumot nem tartalmazó CAM graftok anaglionitikusak maradtak (58. ábra, D), a tenascin-C expresszió jelentősen eltérést mutatott; sem a nyálkahártya alatti rétegben, sem pedig a lamina propriában nem volt kimutatható a tenascin-C (58. ábra, E).



**57. ábra: A vagus régióból származó ganglionléc-eredetű sejtek tenascin-C-t termelnek. A-C.) E8 embryoból a sematikus ábrán jelölt szinteknek megfelelő magasságban készített keresztmetszetek p75 és tenascin-C (TNC) ellenanyag jelölése. Az utóbél submucosális plexusának ganglionléc-eredetű ENCC-jeit tenascin-C veszi körül (A; az A ábrán bekeretezett terület a B ábrán látható kinagyítva), míg a sacralis ganglionléc-eredetű struktúrák, mint a NoR és a plexus pelvicus körül nincs tenascin-C pozitivitás (A, C). HH17 embryo vagus régió (D, 3. őscsigolya) és sacralis (F, 30. őscsigolya) régió szintjén készített keresztmetszetek HNK-1 és tenascin-C-vel jelölve. A (D) és (F) ábra bekeretezett területeinek E-E'' és G-G'' ábrákön látható nagyított felvételei alapján a vagus régióból származó ganglionléc sejtek körül megjelenik, a sacralis ganglionléc sejtek körül viszont nincs tenascin-C immunreaktivitás. Vagus és sacralis velőcsőszakaszokat 24 órán keresztül fibronectinnel borított felszínen tenyésztettük. H-J.) A vagus régióból származó velőcsőtől elvándorló HNK1+ ganglionléc sejteket tenascin-C veszi körül, míg az tenyésztődény felszínén szintén jól vándorló sacralis eredetű ganglionléc sejtek körül nincs tenascin-C pozitivitás. drg, hátsógyöki ganglion; NoR, Remak-ganglion; n, gerinchúr; nt, velőcső; s, őscsigolya; smp, submucosális plexus.**

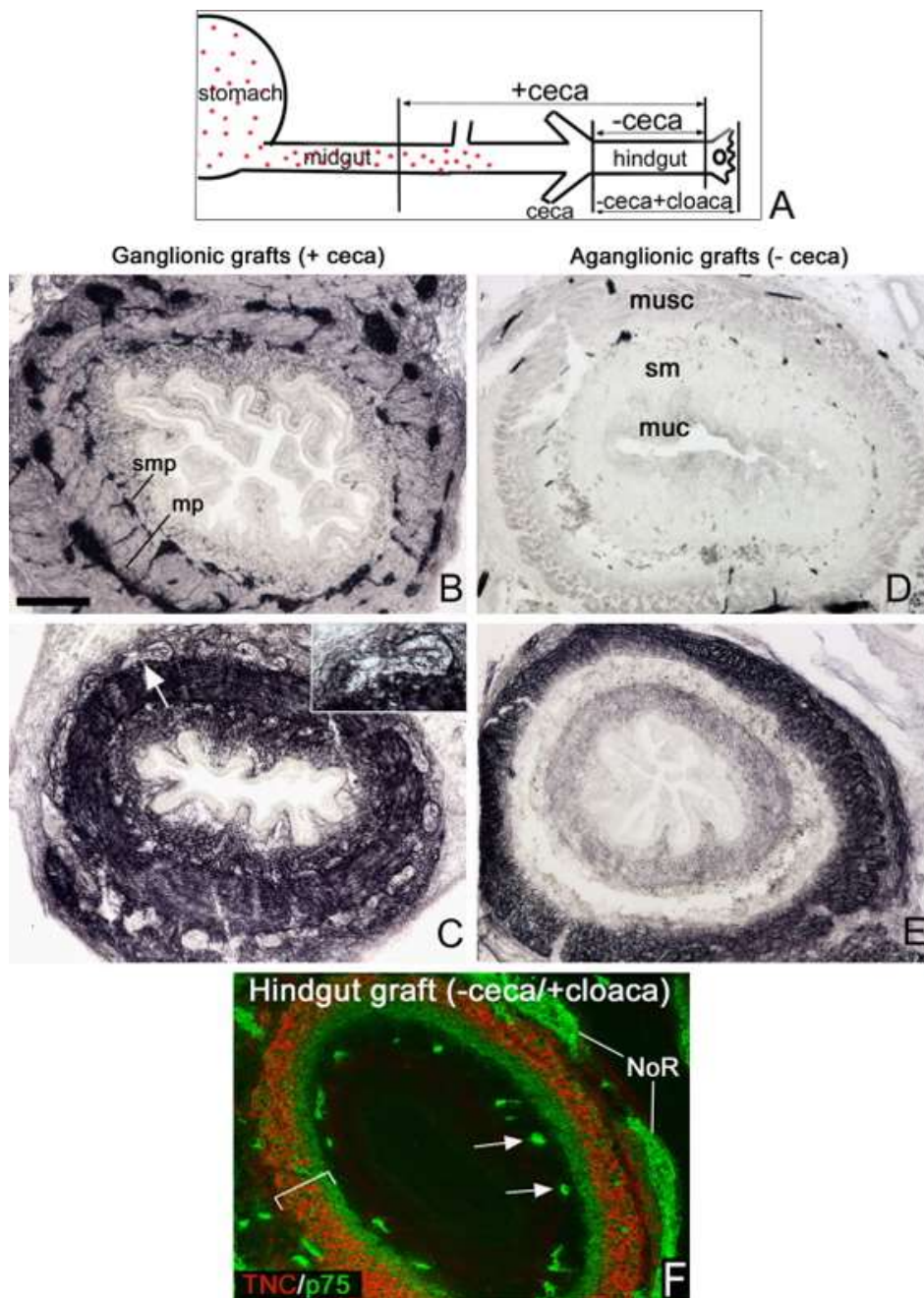
A CAM transzplantációs technika lehetővé tette annak tesztelését is, hogy összehasonlítsuk a vagus és sacralis régióból származó ENCC sejtek tenascin-C expresszióját. Az utóbélhez asszociált Remak-ganglion és plexus pelvicus ganglionjaiban (sacralis velőcső eredetű ganglionlécből képződő képletek) nincs tenascin-C expresszió (nem mutatott adat).

Kiegészítő embryomanipulációs módszerként, velőcső+ganglionléc abláció után is megnéztük az ENCC-k környezetében található tenascin-C expressziós mintázatát. HH9-10 embryokban a velőcső vagus szintjének ablációja aganglionózist okoz az utóbélben. A kontroll embryokból származó utóbélre normális N-cadherin (59. ábra, A) és HuC/D (59. ábra, B) eloszlás jellemző, a tenascin-C (59. ábra, C) expressziója intenzíven a bélidegrendszer körül lokalizálódik. A velőcső ablációval okozott ganglionmentes utóbelekben a tenascin-C expresszió hiányzik a submucosából és a lamina propriából (59. ábra, F).

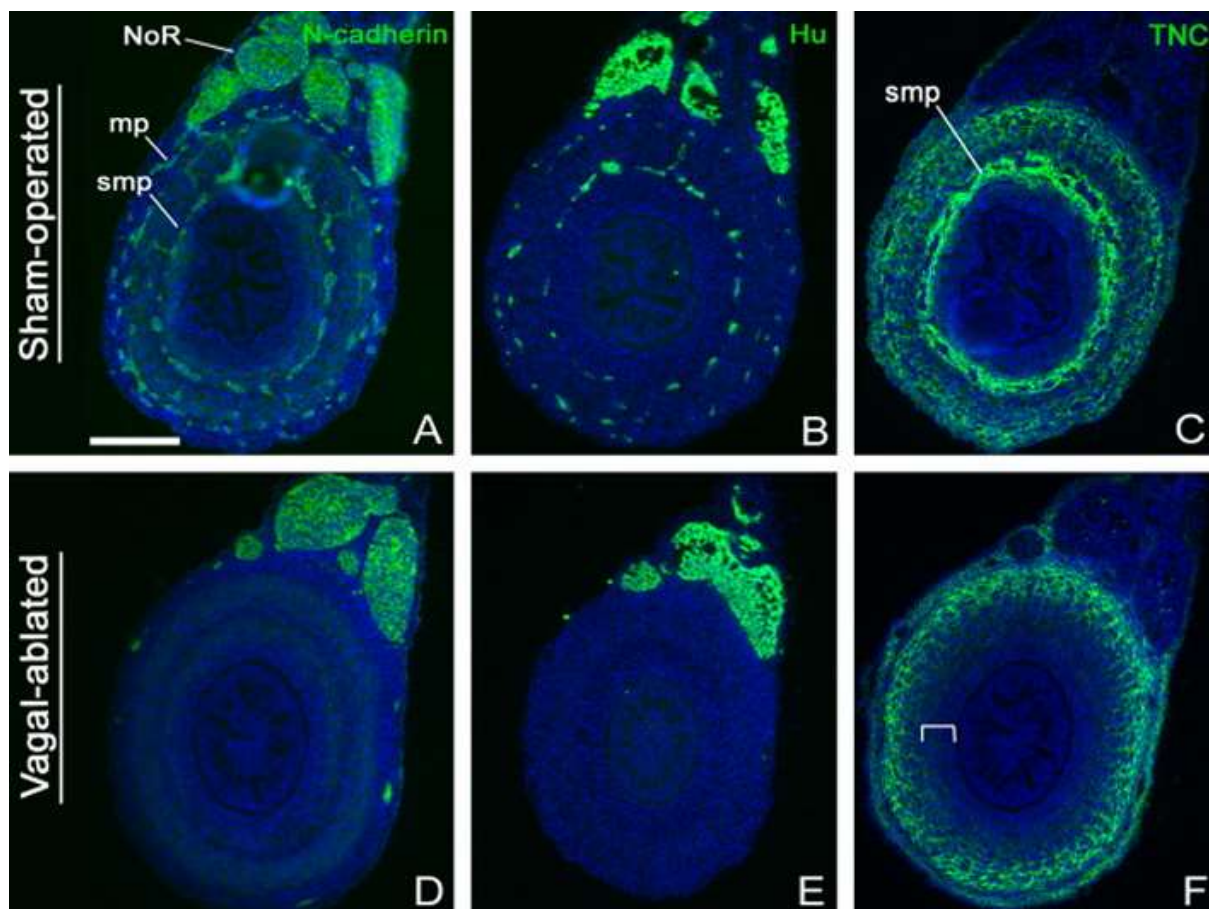
#### 4.7.3. Az ENCC sejtek tenascin-C-t termelnek a bélidegrendszer fejlődése alatt.

Az ENCC markerek és a tenascin-C kolokalizációja, valamint a submucosalis tenascin-C expresszió hiánya az aganglionitikus utóbelekben, azt sugallják, hogy vagy az ENCC sejtek termelik a tenascin-C-t, vagy az ENCC-k jelenléte szükséges a tenascin-C lokális expressziójáért. A kérdés megválaszolására patkány-csirke embryokból létrehozott vékonybél-testüreg kimérákat használtunk. E13.5 patkány embryoból izolált ganglionlécmentes utóbelet E3 csirke embryo testüregébe ültettünk és 7 napig tenyésztettük. Korábban kimutattuk, hogy a testüregbe transzplantált ganglionlécmentes bélszakaszokat a fogadó csirke embryo vagus eredetű velőcsőből származó ENCC sejtjei kolonizálják (Nagy és Goldstein 2006). A graft szignifikáns növekedésen megy keresztül a testüregben való tenyésztés alatt (60. ábra, A), a myentericus plexust a csirke ENCC sejtjei kolonizálják, amit a csirke sejtekre specifikus ellenanyag (8F3), és a p75 (ENCC marker) kolokalizációja bizonyít (60. ábra, B). A graftokban egy belső, p75- csirke sejtekből álló sejtréteg is jelen van, amelyek csirke specifikus endothel markerrel (MEP21) jelölődnek (60. ábra, C). Ez azt mutatja, hogy az ENCC-k mellett endothel sejtek is kolonizálták a graftot. Differenciált csirke neuron marker (CN) expressziója igazolja a plexus myentericus csirke embryo eredetét (60. ábra, D) a patkány embryoból származó graftokban. Párhuzamos metszetek csirke specifikus tenascin-C ellenanyaggal történő jelölése (a patkány eredetű tenascin-C-t nem jelöli; 60. ábra, G), specifikus expressziót mutatott a p75 immunreaktív sejtekkel körül, amely igazolja, hogy ezekben a graftokban a tenascin-C fehérjék forrásai a csirke eredetű ENCC sejtek (60. ábra, E,F).



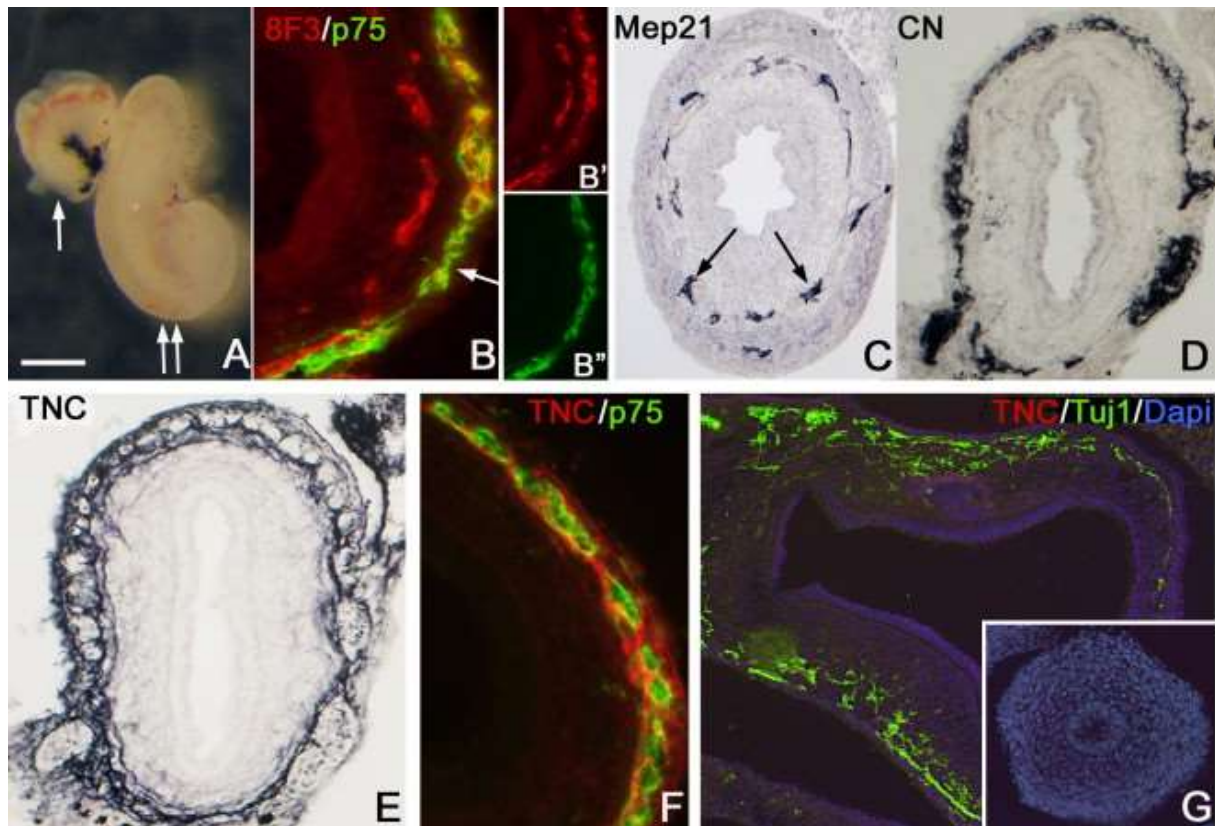


**58. ábra: A ganglionmentes utóbél területén nincs submucosalis tenascin-C expresszió.** Az E5 bélben a vándorló ENCC-k épp hogy elhagyják az umbilicalis régió magasságát. A sematikus ábrának (A) megfelelően, a vándorló ENCC-k legelső sejtjeit is tartalmazó (+coecum) vagy coecum nélküli (-coecum) distalis bélszakasza 8 nap CAM tenyésztés után ganglionokat tartalmazó (+coecum), illetve ganglionmentes (-coecum) utóbelet hozott létre. A ganglionokat tartalmazó graft keresztmetszeti képén normál Tuj1 (B) és tenascin-C (C) expresszió látható. A ganglionmentes graft területén hiányoznak az enterikus neuronok (Tuj1, D) és nincs tenascin-C expresszió a submucosalis területen (E). Cloacát és Remak-gangliont tartalmazó E5 (preganglionotikus) utóbél 9 napos embryo CAM-ján történő 6 napnyi tenyésztésével csak sacralis-eredetű ENCC-eket tartalmazó utóbelet hoztunk létre, amelyeket p75 (zöld) és tenascin-C (piros) ellenanyagokkal festettünk meg. Az (F) ábrán látható szögletes zárójel a tenascin-C réteg; NoR, Remak-ganglion; sm, submucosa; smp, plexus submucosus.

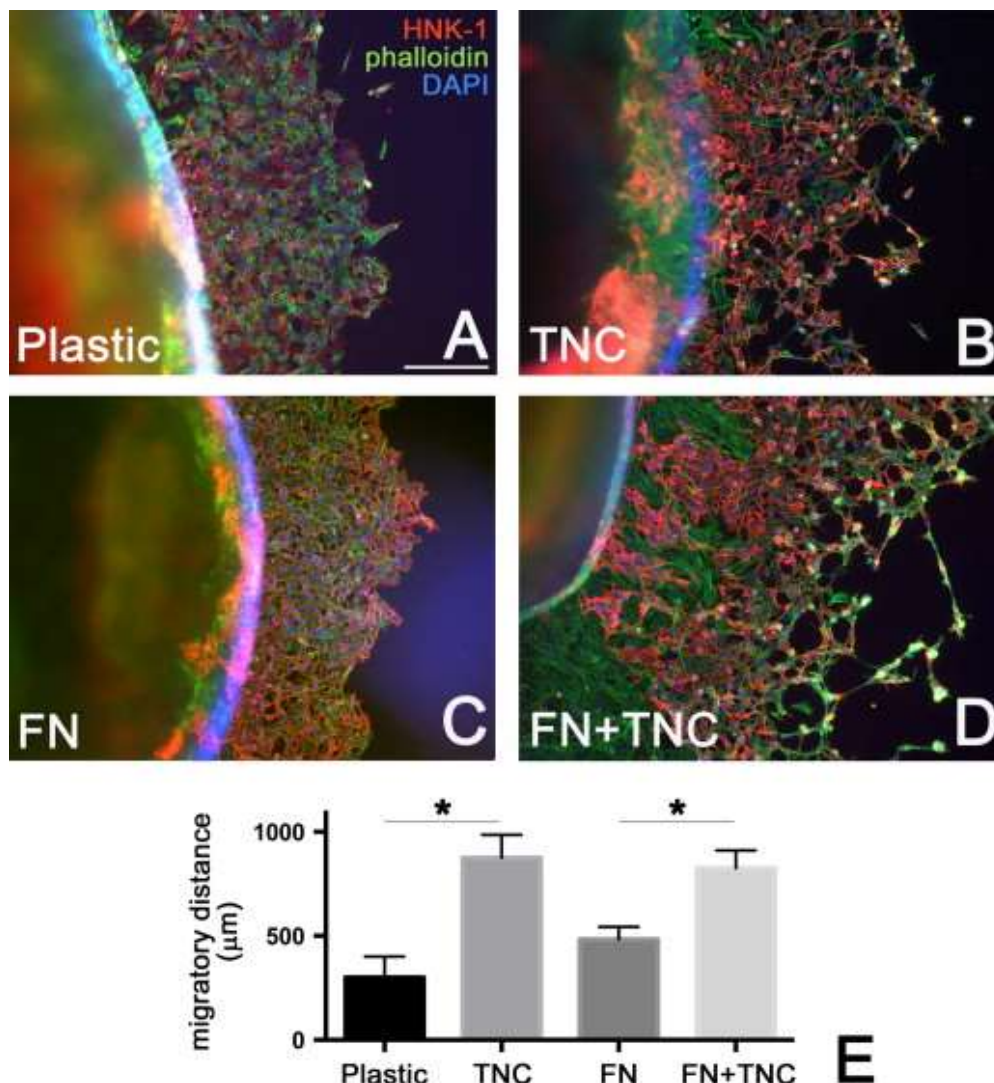


**59. ábra: Az utóbél submucosalis régiójának normál tenascin-C expressziójához az ENCC-k jelenléte szükséges.** Vagus régióinak velőcső ablációval *in ovo* ganglionmentes utóbeleket hoztunk létre. A kontroll (velőcső abláció nem történt) E9 embyo utóbelének keresztmetszetén normál eloszlású ENCC-k (N-cadherin, **A**), enterális neuronok (HuC/D, **B**) és tenascin-C expresszió (**C**) figyelhető meg. A velőcső vagus régiójának ablációján átesett embryokban ganglionmentes utóbél jön létre (**D**, **E**) ahol a tenascin-C submucosalis expressziója kifejezetten hiányzik (**F**, szögletes zárójel a submucosa réteget jelöli), mp, plexus myentericus; NoR, Remak-ganglion; smp, plexus submucosus.





**60. ábra: Patkány-csirke embryo testüregkiméra igazolja az ENCC-k tenascin-C termelő képességét.** **A.)** E13.5 patkány preganglionáris distalis utóbélét E3 csirke testüregébe transzplantáltuk, majd 7 napig tenyésztettük. 2 nap (A, nyíl) illetve 7 nap (A, kettős nyíl) elteltével a graft testüregben bekövetkező szignifikáns méretbeli növekedése látható. **B.)** 8F3 és p75 ellenanyagokkal készített kettős immunfluoreszcens festés igazolja a patkány bél plexus myentericus található ENCC-k csirke eredetét (B, nyíl). A 8F3 és a p75 festés a B' és B'' ábrákon külön-külön is megfigyelhető. **C.)** A 8F3+ sejtek belső rétege a külsővel ellentétben nem mutat koexpressziót a p75-tel, azonban expresszálja a csirke-specifikus endothel sejt marker MEP-21-et (nyíl). **D.)** A graft CN-immunreaktivitása igazolja a csirke-eredetű neuronok jelenlétét. **E.)** A csirke-specifikus anti-tenascin-C ellenanyag-festéssel a patkány utóbél graft myentericus ganglionjai körül markáns tenascin-C expresszió figyelhető meg. **F.)** Csirke-specifikus ellenanyagokkal végzett kettős immunfluoreszcens festés igazolja az ENCC-k és a tenascin-C csirke eredetét. **G.)** A E14.5 patkány embryóból származó gyomor (G; Tuj1, zöld) és preganglionotikus vastagbél (G, bekeretezett ábra) nem festődik csirke-specifikus tenascin-C ellenanyaggal (piros szín).



**61. ábra: A tenascin-C támogatja az ENCC-k migrációját.** A tenascin-C ENCC vándorlásra kifejtett hatásának meghatározásához, E6 középbél és utóbél szakaszát műanyag (A), tenascinnal (B), fibronectinnel (C) vagy fibronectin+tenascinnal (D) bevont felületre ültettük. 48 órával később a coecum régió magasságában HNK-1 (piros), phalloidin (zöld) és DAPI (kék) festéssel vizsgáltuk az ENCC vándorlását. Mindegyik felszín esetében meghatároztuk az ENCC-k vándorlási távolságát (E). \* $p < 0.05$ . FN, fibronectin, TNC, tenascin-C.

Csirke-patkány kimérékből kapott eredmények azt igazolják, hogy az ENCC sejtek tenascin-C-t expresszálnak. Azonban, a bél mesenchymája szintén termel tenascin-C-t, amit a molekula ENCC-k kolonizációja előtti jelenléte is alátámaszt (55 és 57. ábra), és expressziója a külső mesenchymában a kísérletesen előállított aganglionózis esetén is megfigyelhető (58 és 59. ábra). Ezek alapján azt feltételeztük, hogy az ENCC sejtek és a bél mesenchymája talán a tenascin-C fehérjék különböző izoformáit expresszálják. A tenascin-C-nek három lehetséges izoformája van csirkében, amelyek a III-as típusú fibronectin-szerű

ismétlődésekben térnek el egymástól. A hosszú, közepes és rövid variánsok rend szerint a következők: 230 kDa 11 III-as típusú fibronectin-szerű ismétlődéssel, 200 kDa 9 és 190 kDa 8 ismétlődéssel (Tucker, 1993). Ezek a különböző variánsok eltérő szerepet töltenek be a fejlődésben, pl. a hosszú változat a sejtmozgást, a rövidebb pedig a sejtproliferációt és differenciációt indukálja (Tucker, 1993). Hogy megvizsgáljuk hipotézisünket, E7 vékonybélrészekről eltávolítottuk a Remak-gangliont, és áramlási citometriát alkalmaztunk N-cadherin használatával, hogy elkülönítsük az ENCC sejteket (N-cadherin+) a nem-ENCC sejtektől (N-cadherin-). Kvantitatív PCR-t alkalmaztunk tenascin-C izoforma-specifikus primereket használva. Az N-cadherin+ ENCC sejtek sikeres szétválasztását a bél többi részétől az erős SOX10 expresszió is bizonyítja, amely az N-cadherin- populációk esetén nem jellemző. A tenascin-C mindhárom izoformája kifejeződik az N-cadherin+ és az N-cadherin- sejtekben, illetve mindegyik izoforma nagyobb mértékben expresszálódik N-cadherin+ sejtpopulációk esetén. Ezek az eredmények cáfolják a hipotézisünket, miszerint az ENCC sejtek és a bél mesenchyma különböző expressziós profillal rendelkezik.

#### 4.7.4. A tenascin-C elősegíti az ENCC sejtek migrálását.

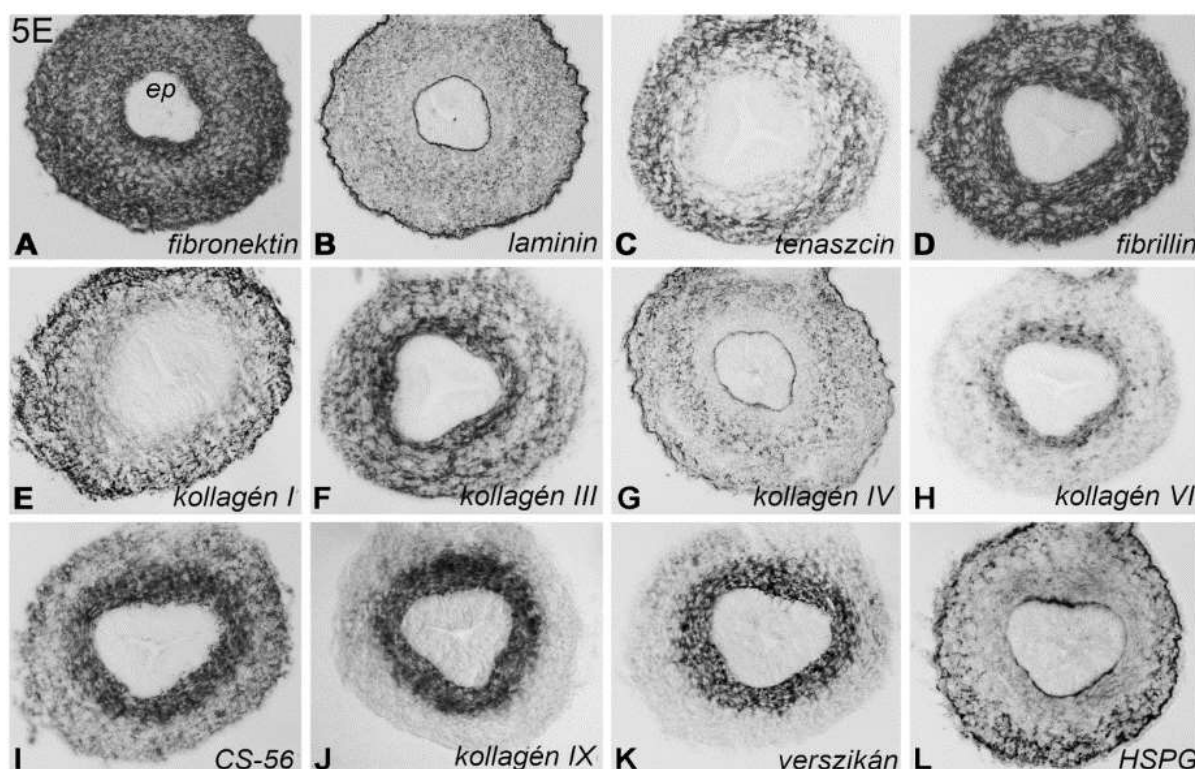
A tenascin-C sejtvándorlást támogató hatását az ENCC sejtekre nézve E6 csirke középbelek fibronectinnel és tenascin-C-el bevont felszíneken való tenyésztésével teszteltük. Mind az HNK-1+ és HNK-1- sejtek kivándorolnak a tenyésztett bélszakaszból, az utóbbit alpha-simaizom aktin+ sima izom sejteknek, illetve a vimentin+ fibroblastoknak határoztuk meg (Nagy és mtsai. 2009). A HNK1+ ENCC sejtek 48 óra inkubálás alatt megtett vándorlási távolságát hasonlítottuk össze. Az ENCC sejtek nagyobb távoslágra vándoroltak tenascin-C-vel bevont felületen (875+222  $\mu\text{m}$ ), mint a sima műanyag felületen (300+173  $\mu\text{m}$ ), és ez a különbség statisztikailag szignifikáns volt. Ehhez hasonlóan, amikor az ENCC sejtek migrációját fibronectin (483+104  $\mu\text{m}$ ), illetve fibronectin+tenascin-C (825+171  $\mu\text{m}$ ) felületeken hasonlítottuk össze azt találtuk, hogy az ENCC sejtek tenascin-C jelenlétében szintén messzebbre vándoroltak (61. ábra).

#### **4.9. Agrin és kollagén XVIII szerepe a bélidegrendszer fejlődésében.**

##### 4.9.1. ECM molekulák expressziós mintázata a fejlődő bélben.

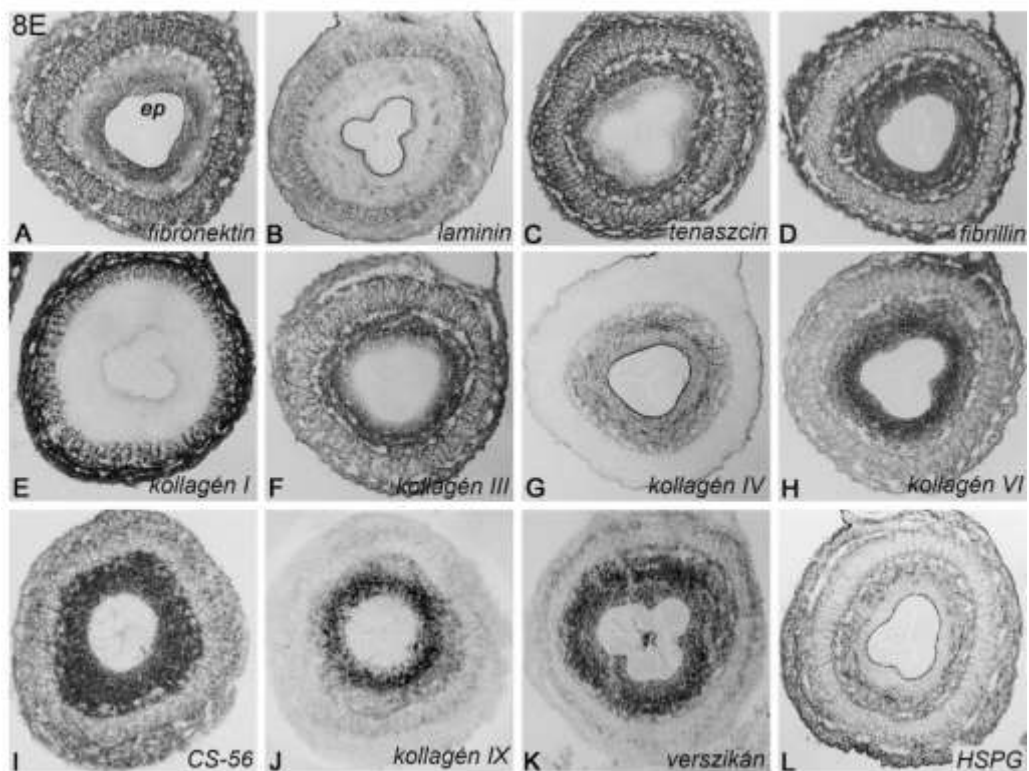
A tenascin-C-t célzó vizsgálatok után részletesen elemeztük a csirke embryo közép-, és utóbélszakaszának ECM összetételét. Az ECM-specifikus immuncitokémiai festéseket az ENCC-k kolonizációja előtt (E5), alatt (E8), és (E14) után hasonlítottuk össze, hogy olyan mátrix molekulákat azonosítsunk, amelyek a bélidegrendszer fejlődésében szerepet játszhatnak. Amint az a 62. ábrán látható, az E5 stádiumban, az ENCC-k érkezése előtt az utóbélben a glikoprotein típusú ECM molekulák (fibronectin, laminin, tenascin-C és fibrillin) diffúz módon expresszálódnak a mesenchymában. A kollagén I, III és IV is kiterjedt területen expresszálódik, bár a kollagén I a külső mesenchymában koncentrálódik, és a kollagén III expressziója intenzívebb a belső mesenchymában (62. ábra). A kollagén VI, a kondroitin-szulfát proteoglikánok (CS-56, a kollagén IX és a versican) mind a belső mesenchymában koncentrálódnak, a heparán szulfát proteoglikánok (HSPG) kifejezetten a bél külső rétegében expresszálódnak. E8 és E14 stádiumban, miután az utóbél ENCC kolonizációja befejeződött, az ECM expresszió jelentősen megváltozott (63. és 64. ábra). A HSPG molekulák expressziója a submucosalis és a myentericus ganglionok környékén koncentrálódott. A HSPG-k és az ENCC kapcsolatának részletes vizsgálatára az E14 csirke utóbélét neuronális marker HuC/D ellenanyaggal (65. ábra, A) és a HSPG típusú (kollagén XVIII, agrin, perlecan) ECM-et felismerő ellenanyagokkal jelöltük (65. ábra, B,C,D). A kollagén XVIII (képeken Col18-ként van jelölve) kifejezetten a ganglionokban expresszálódik, míg az agrin és a perlecan diffúzabban lokalizálódnak a mesenchymában, ahol az agrin koncentrált periganglionikus immunreaktivitást mutat (65. ábra, C beillesztés). A kollagén XVIII (65. ábra, E) és az agrin (65. ábra, F) ganglionokhoz asszociált expressziója posztnatálisan a 2 napos csirke utóbélében, valamint négy hetes egér vastagbélben (65. ábra, G-J) továbbra is jellegzetesen megmarad. A Wnt1; tdT egerekből származó vastagbélszakaszokon a kollagén XVIII (65. ábra, G,H) mellett, endostatint (kollagén XVIII C-terminális végén található epitóp) és agrint (65. ábra, J) felismerő specifikus ellenanyagokat is használtunk, amelyek erős immunreaktivitást mutattak az egér enterális ganglionja körül.

A HSPG expresszió és az ENS kialakulása közötti térbeli és időbeli összefüggést az E7-12 csirke utóbél hosszmeteszetein kettős immunfluoreszcenciával vizsgáltuk. Az E7 stádiumban a legelől haladó p75+ ENCC-k az utóbél közepén vannak (66. ábra, A) és kollagén XVIII-cal vannak körülvéve (66. ábra, B). Érdekes módon a kollagén XVIII a bél ganglionált részében található subepithelialis mesenchymában is expresszálódik (66. ábra, A; nyíl), míg a ganglionokat nem tartalmazó distalis szegmensből hiányzik (66. ábra, A; csillag). Az agrin a basalis membránban expresszálódik, de az enterális ganglionok nem fejezik ki (66. ábra, D). A következő napokon az ENCC-k környezetében kifejezettebb a kollagén XVIII expresszió (66. ábra, F, H, I). E10 stádiumban a proximális utóbélben lévő ENCC-k agrint veszi körül (66. ábra, J,K); perlecan csak az erek körül és a submucosalis mesenchymában fordul elő (66. ábra, L). E12 utóbélben, amikor az ENS kolonizációja befejeződött és a gangliogenezis folyamata kezdetét veszi, az ENCC-eket kollagén XVIII és agrin expresszió jellemzi (66. ábra, M,N) ezzel szemben, a perlekán az összes vizsgált embryonális stádiumban hiányzik a ganglionokból (66. ábra, O).

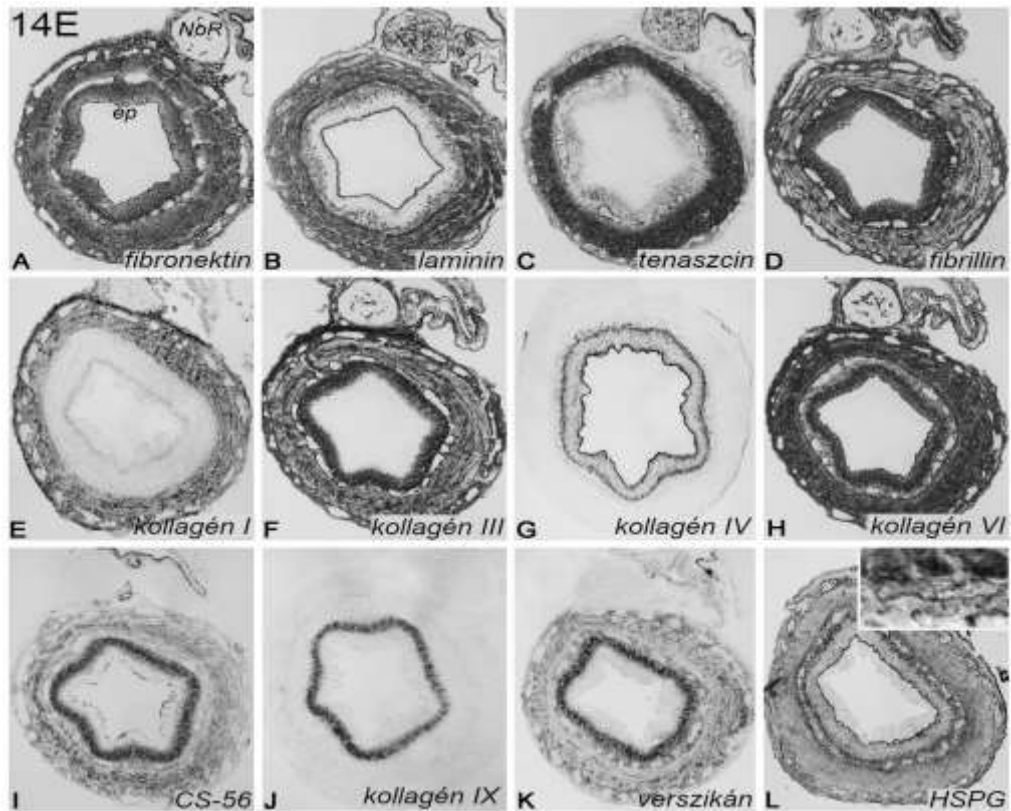


62. ábra: Extracelluláris mátrix mintázata E5 csirke embryo utóbélében.

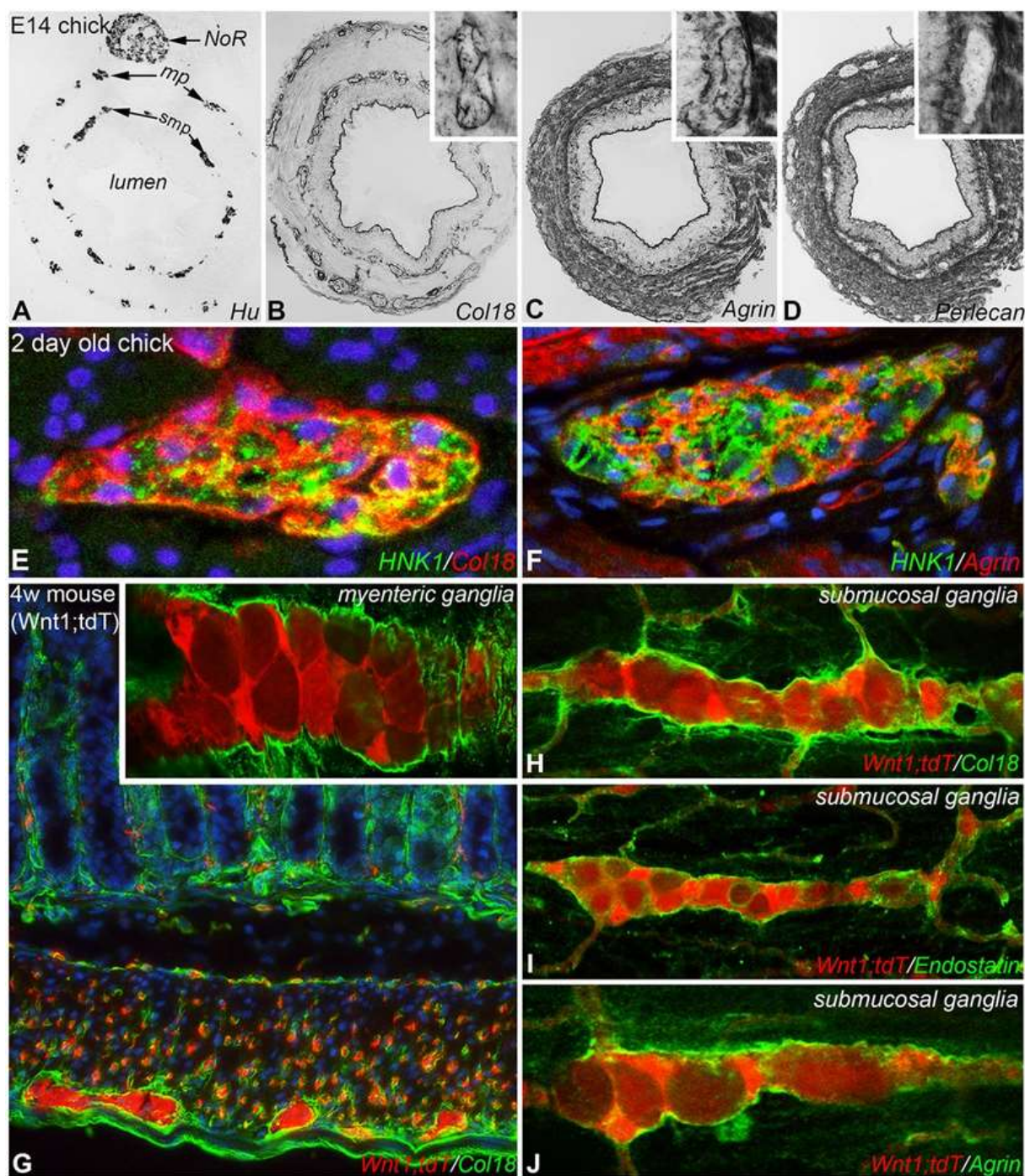




63. ábra: Extracelluláris mátrix mintázata E8 csirke embryo utóbelében.

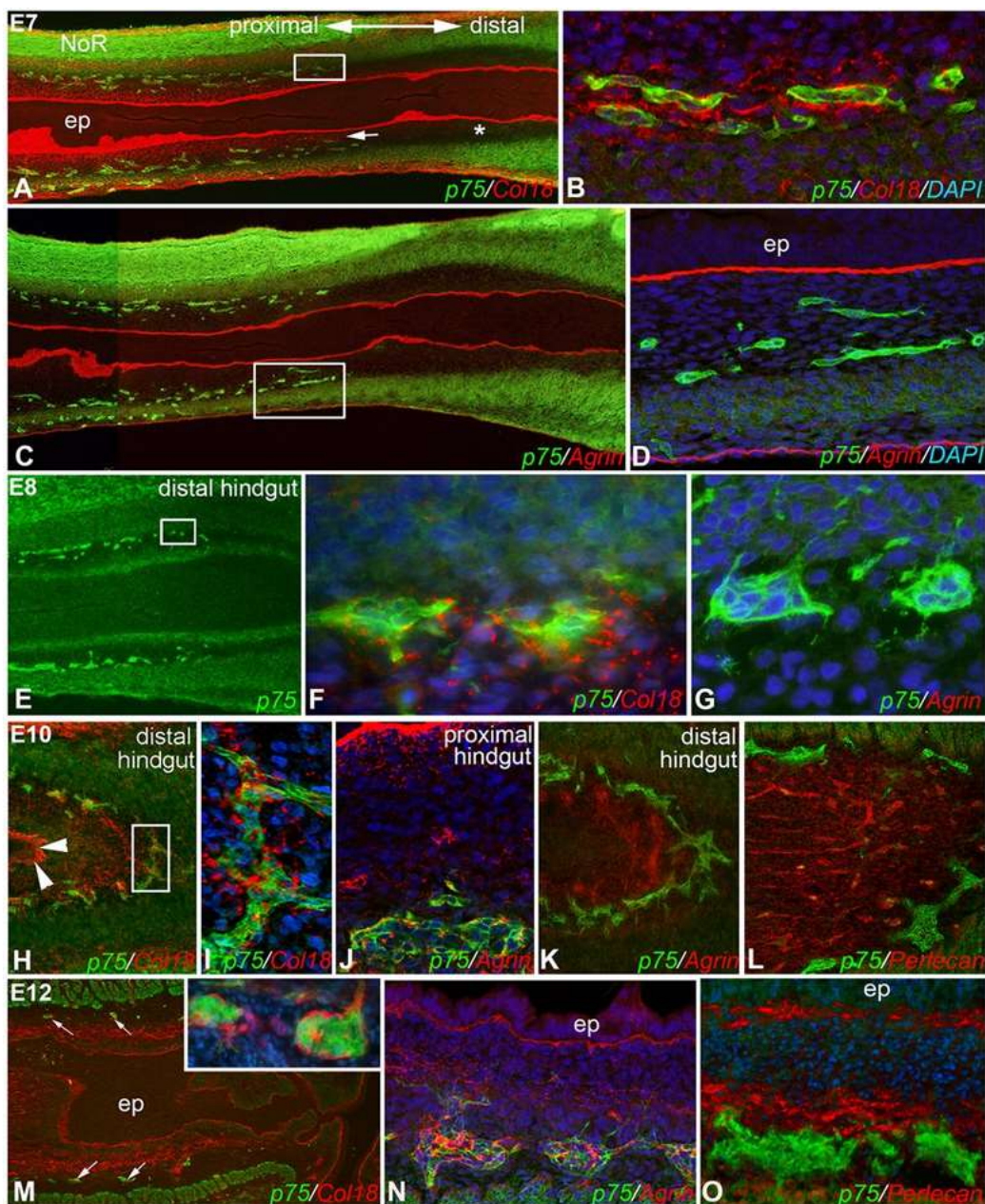


64. ábra: Extracelluláris mátrix mintázata E14 csirke embryo utóbelében.  
NoR, Remak-ganglion.



**65. ábra: A csirke és az egér bélidegrendszere HSPG-okat expresszál. E14 csirke embryoból származó vastagbél keresztmetszetének (A) HuC/D, (B) kollagén XVIII, (C) agrin és (D) perlecan specifikus immunfestése. A kollagén XVIII (E) és az agrin (F) a kikelt 2 napos csirke colorectumának HNK-1+ ganglionjai körül és azokon belül is kifejeződik. A 4 hetes (4w) *Wnt1;tdT* egér vastagbélének (G-H) kollagén XVIII, (I) endosztatin és (J) agrin specifikus immunfestése a HSPG-k jellegzetes periganglionáris expresszióját mutatja. Mp, plexus myentericus; smp, plexus submucosus, NoR, Remak-ganglion**



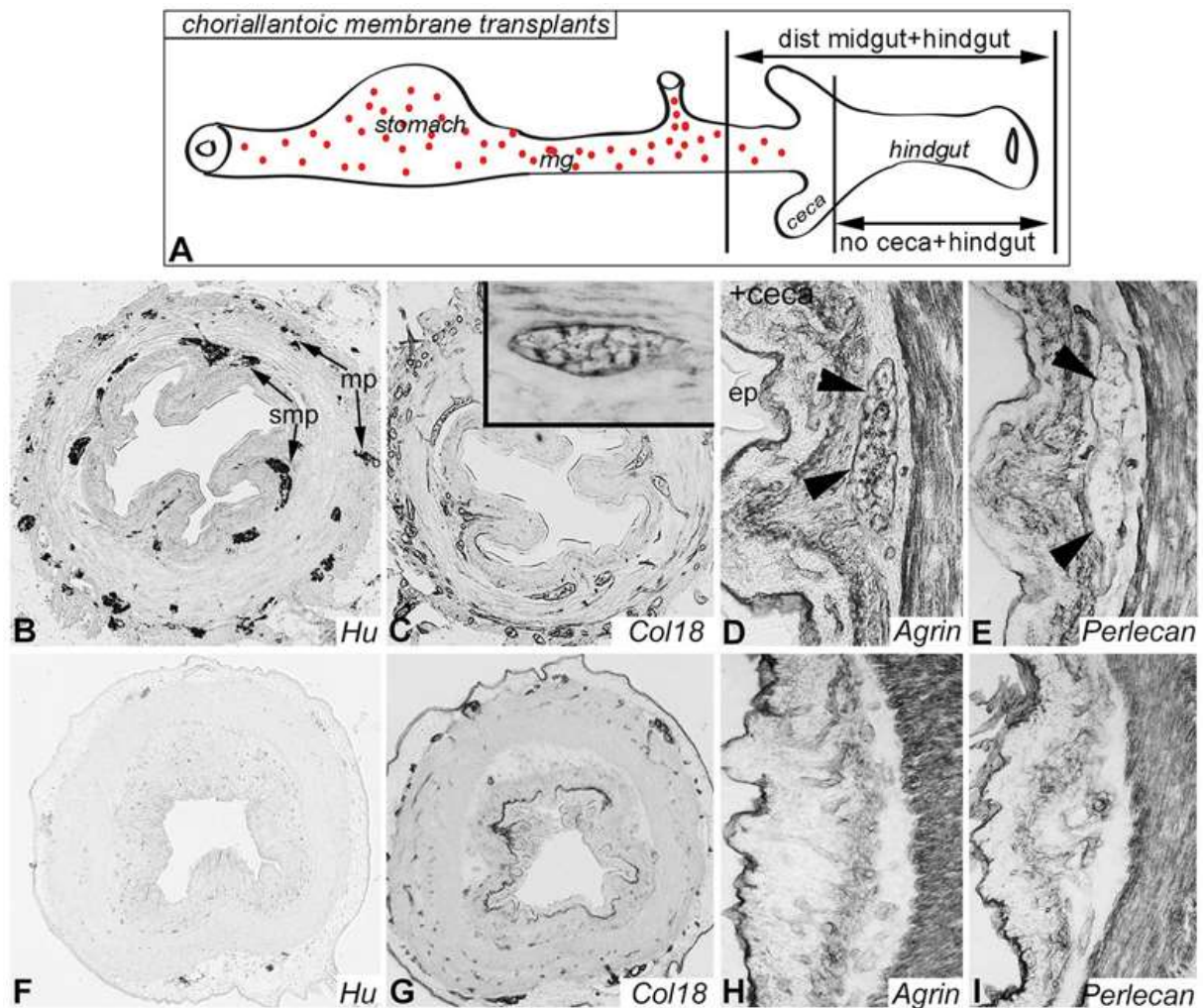


**66. ábra:** A legelöl vándorló ENCC-eket kollagén XVIII veszi körül. **(A-D.)** 7 napos csirke embrióban a legelöl haladó enterális ganglionléc-eredetű sejtek az utóbél középső szakaszánál járnak [(**B**) és (**D**) kép az (**A**), illetve (**C**) ábrán bekeretezett terület kinagyítva]. (**B**) Az elől haladó, p75+ enterális ganglionléc-eredetű sejtek kollagén XVIII veszi körül, de (**D**) agrin nem látható. (**E**) 8 napos embrióban a legelső sejtek már az utóbél distalis szakaszánál járnak, (**F**) körülöttük továbbra is fokozott a kollagén XVIII expresszió. (**G**) Agrin továbbra sem ábrázolódik. (**A**) A bél ganglionált szakaszán a hám alatti mesenchymában is expresszálódik kollagén XVIII (nyíl), (**A**) míg a ganglionmentes területén ez nem figyelhető meg (csillag). (**H**) E10 korban az utóbél enterális ganglionléc-eredetű sejtjei körüli kollagén XVIII expresszió megtartott [nyílhegy jelöli a kollagén XVIII+ hám bazálmembránt; (**I**) a bekeretezett terület kinagyítva]. (**J**) A 10 napos embrió utóbélének proximális szakaszán megjelenik a ganglionok körüli agrin expresszió, (**K**) a distalis területen továbbra sem fejeződik ki. (**L**) A perlekán periganglionárisan nem mutatható ki. E12 stádiumban a ganglionok területén már egyöntetűen (**M**) (nyíl a submucosalis ganglionokat mutatja; a bekeretezett területen ezek egyike látható kinagyítva) kollagén XVIII és (**N**) agrin expresszió is megfigyelhető, (**O**) azonban a perlekán továbbra sem fejeződik ki. Ep, epithelium; NoR, Remak-ganglion

#### 4.9.2. ENCC-k jelenléte szükséges a bélidegrendszerhez-asszociált kollagén XVIII és agrin expresszióhoz.

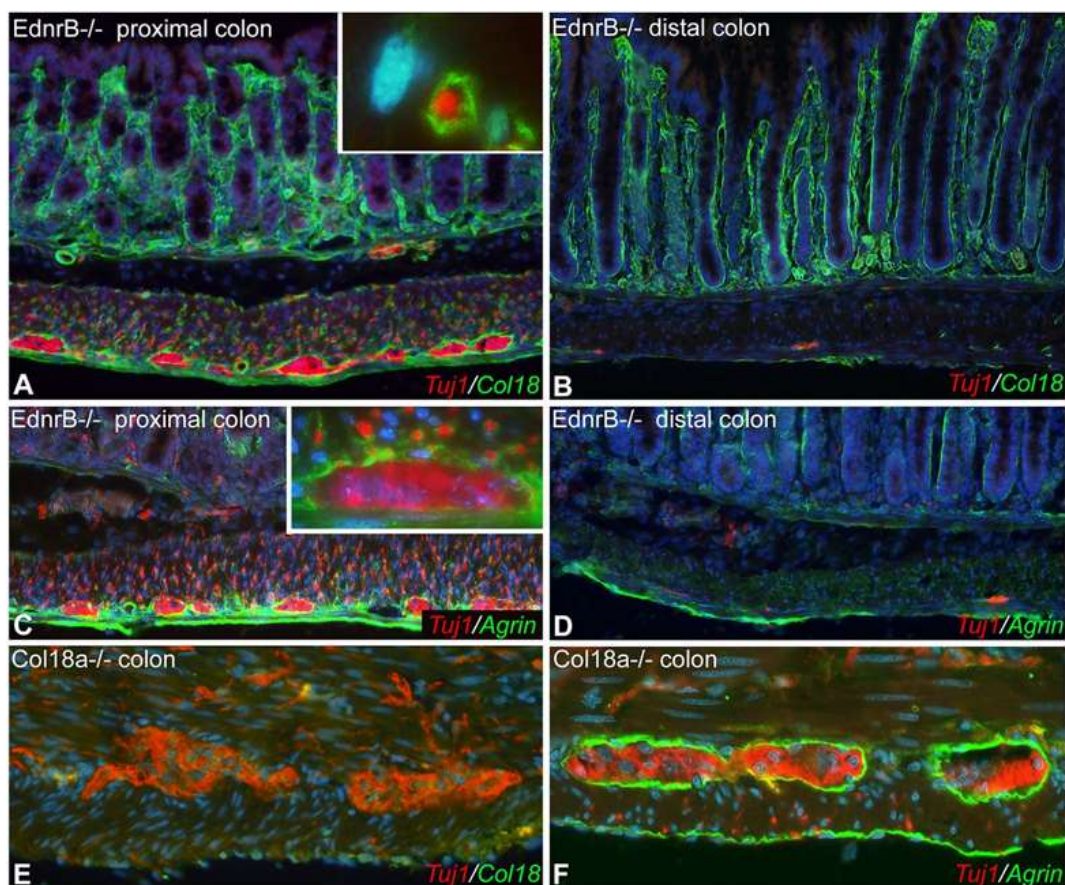
A kollagén XVIII és az agrin molekulák ENCC-khez köthető expressziója felveti a kérdést, hogy a ganglionléc-eredetű sejtek szükségesek a HSPG fehérjék expressziójához. Először kísérletes aganglionikus utóbelet állítottuk elő a korábban leírt módszer szerint. Röviden, az E5 csirke utóbelet coecum, Remak-ganglion és cloaca eltávolítása után 9 napig CAM-on tenyésztettük (67. Ábra). A bélidegrendszert nem tartalmazó (Hu negatív) explantátumokban a kollagén XVIII és az agrin expresszió jelentősen megváltozik; mindkét HSPG fehérje expressziója hiányzott a plexus submucosus és myentericus területéről. A kollagén XVIII az epitheliális basalis membránokban és a nagy erek falában, míg az agrin a simaizom, az epithelium és az erek basalis membránjában továbbra is intenzíven expresszáldott. A perlecan expresszió változatlan maradt (67. ábra, I).

A genetikai aganglionózist mutató vastagbél 3 hetes *Ednrb*<sup>-/-</sup> null-mutáns egerekből származott (68. ábra, A-D). Az *Ednrb*<sup>-/-</sup> egerek proximális, bélidegrendszert tartalmazó vastagbele erős kollagén XVIII expressziót mutat az enterális ganglionok és az ezeket egymással összekötő rostok körül (68. ábra, A). Ezzel szemben, a ganglionmentes distalis vastagbélben nincs kollagén XVIII expresszió (68. ábra, B). Az agrin ganglionok körüli expressziója szintén hiányzik a ganglionmentes szegmensben (68. ábra, D). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az ENCC-k szükségesek a kollagén XVIII és az agrin enterális ganglionokhoz asszociált expressziójához. Annak tesztelésére, hogy szükség van-e ezekre a HSPG-ekre a bélidegrendszer fejlődéséhez, megvizsgáltuk a *kollagén XVIII* null-mutáns egerek vastagbélét. Habár a mutáns állatokban hiányzik a kollagén XVIII, az agrin expresszió változatlan, a myentericus ganglionok normális morfológiát mutattak (68. ábra, E,F).



**67. ábra: A periganglionáris kollagén XVIII és agrin expresszióhoz enterális ganglionléc-eredetű sejtek jelenléte szükséges. (A)** E5 csirke embryo utóbelét coecummal együtt vagy coecum nélkül E9 csirke embryo CAM membránjára transzplantáltuk. 9 nap elteltével a közép és utóbelet tartalmazó explantátum vastagbelének területén **(B)** HU+ enterális neuronokat tartalmazó ganglionok körül **(C)** kollagén XVIII (a bekeretezett részben kollagén XVIII-at expresszáló ganglion látható), **(D)** agrin és **(E)** perlekán expresszió figyelhető meg. A **(D)** és **(E)** ábrán a nyílhegyek submucosalis ganglionokra mutatnak. A coecum nélkül transzplantált (ganglionmentes) bélszakaszban **(F)** az enterális neuronok hiányát, **(G)** rendellenes kollagén XVIII és **(H)** agrin expresszió kíséri. **I.)** A perlecan expresszió nem váltotozott meg. Ep, epithelium; mp, plexus myentericus; smp, plexus submucosus





**68. ábra:** Az *EdnrB*<sup>-/-</sup> egér vastagbélében hiányzik a kollagén XVIII és az agrin expresszió. **(A)** A 3 hetes *EdnrB*<sup>-/-</sup> egér vastagbélének proximális, ganglionokat tartalmazó területén a Tuj1+ enterális ganglionok és azok rostjai körül jellegzetes kollagén XVIII expresszió figyelhető meg (a kinagyított képen Tuj1+ rost látható). **(B.)** A vastagbél distális, ganglionmentes területén hiányoznak a Tuj1+ sejtek és a muscularis rétegben nincs kollagén XVIII expresszió. **(C.)** A vastagbél ganglionokat tartalmazó szakaszának ganglionjai körül agrin expresszió ugyancsak megfigyelhető, de **(D)** a ganglionmentes bélfalban nincs periganglionáris agrin expresszió. A 6 hetes, *kollagén XVIII*<sup>-/-</sup> null mutáns egér normál **(E)** Tuj1 és **(F)** agrin expressziót mutat.

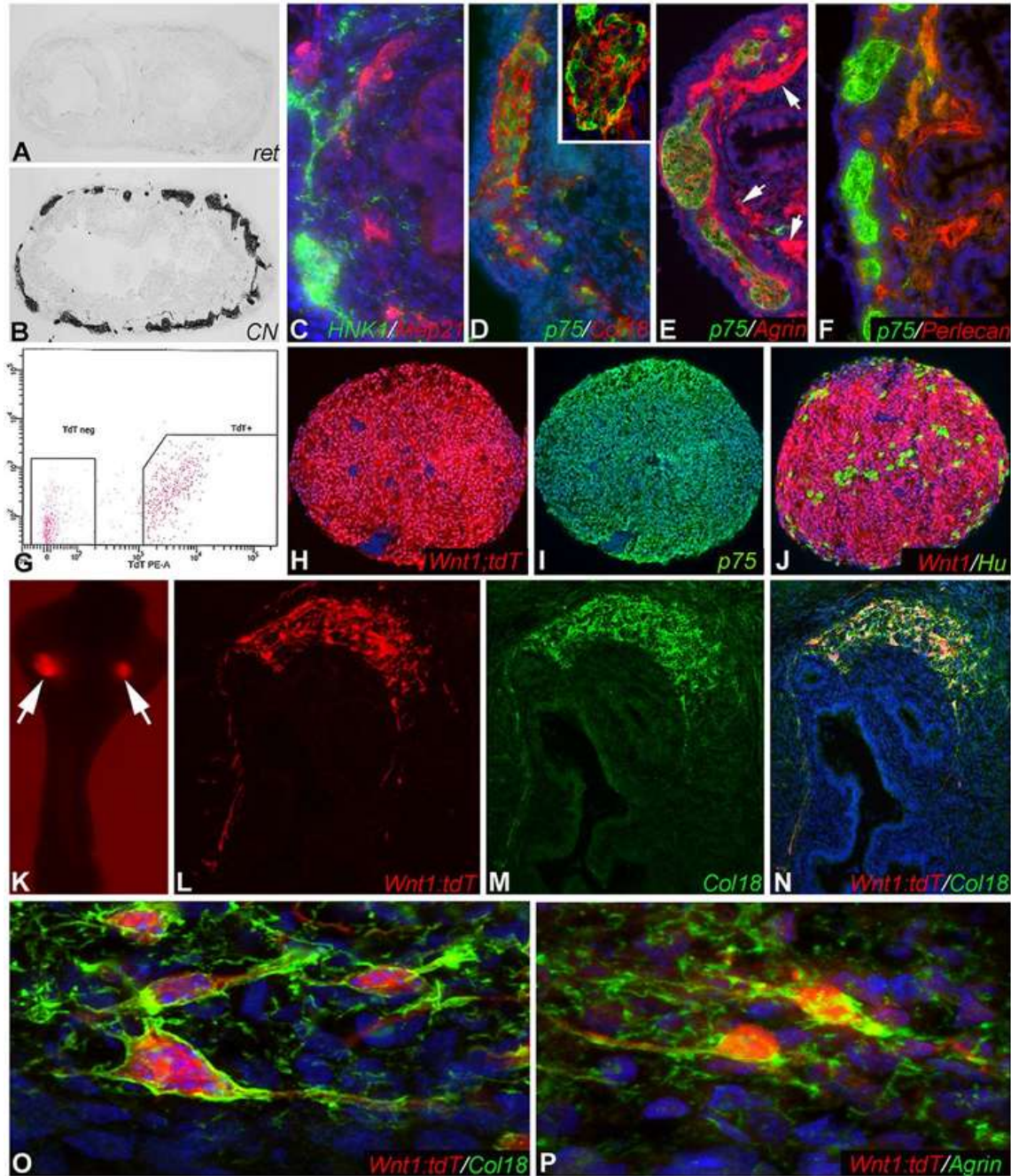
#### 4.9.3. ENCC-k kollagén XVIII és agrin típusú HSPG-t termelnek.

Amikor E11.5 egér utóbelét átültettünk E3 csirke embryo primitív testüregébe (Nagy és Goldstein, 2006b) a graftot a fogadó embryoból származó ganglionléc-eredetű sejtek kolonizálják és endothélsejtek vaszkularizálják. Az egér-specifikus RET immunreaktivitás hiánya (69. ábra, A), valamint a csirke neuronokra specifikus CN immunreakció (69. ábra, B) igazolja a bélidegrendszer csirke eredetét. A kiméra bélből készített metszetek immunfluoreszcens vizsgálata szerint a graftot HNK1+ és p75+ csirkéből származó ganglionléc sejtek (69. ábra, C,D,E,F) és az MEP21 + csirke eredetű endothel sejtek kolonizálják (69. ábra, C). A madár specifikus kollagén XVIII (69. ábra, D), az agrin (69. ábra, E) és a perlecan

(69. ábra, F) ellenanyagok alkalmazása igazolja, hogy a HSPG típusú ECM molekulákat csirkéből származó sejtek termelik. A kollagén XVIII-at (Halfter és mtsai., 1998) specifikusan a csirke ENCC-k expresszálják (69. ábra, D). Az agrint (Tsen és mtsai., 1995) az ENCC-k és a fogadó embryoból származó erek is kifejezik (69. ábra, E, nyilak). A perlecant (Hummel és mtsai., 2004) erősen expresszálják a csirkéből származó erek, de a csirke-eredetű ENCC-k nem termelik (69. ábra, F). Az embryomanipulációval kapott eredmények azt mutatják, hogy az ENCC-k maguk is termelnek kollagén XVIII-at és agrint, perlekánt viszont nem expresszálnak.

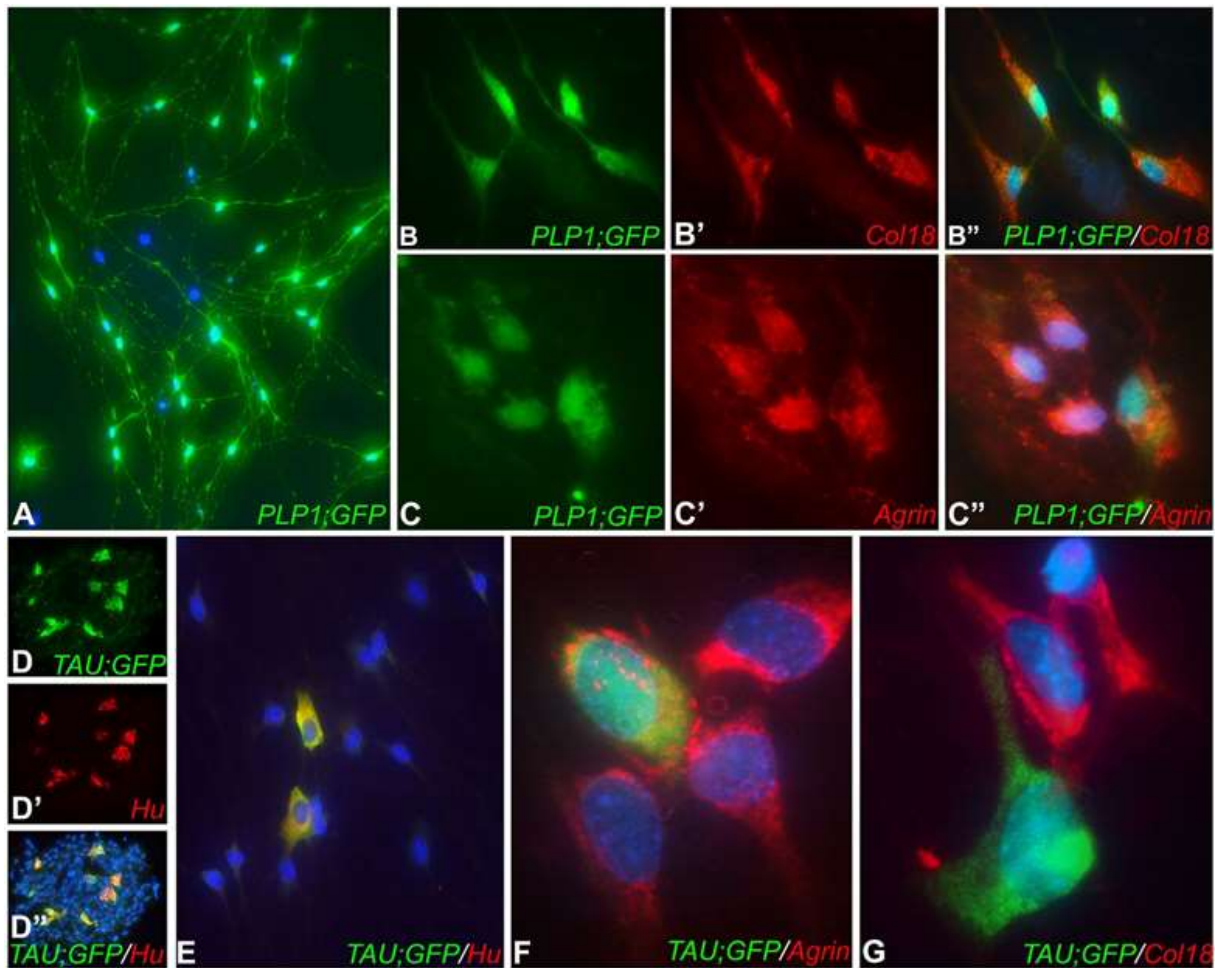
Annak igazolására, hogy az emlős ENCC-k is képesek kollagén XVIII és az agrin expresszióra, 3 hetes *Wnt1;tdT* egér vékonybeléből idegi sejtaggregátumokat (neurosphere) állítottunk elő a korábbi közelményeinkben leírt protokollt követve (Hotta és mtasi, 2016; Belkind-Gerson és mtsai., 2017; Cheng és mtsai., 2017). A *Wnt1+* sejteket áramlási citometriával izoláltuk (69. ábra, G). Az idegi sejtaggregátumok előzetes vizsgálata igazolta, hogy a sejteket diffúz *Wnt1* (69. ábra, H) és felszíni *p75* expresszió jellemezte (69. ábra, I), amelyek között elszórtan *HU+* neuronok is kimutathatók (69. ábra, J). A kísérlet során az idegi sejtaggregátumokat E5 csirke embryo coecalis régiójába ültettük (69. ábra, K) és a rekombinált szövetet E9 fogadó embryo CAM membránján tenyésztettük. A graftokat 9 nap elteltével egér specifikus kollagén XVIII és agrin ellenanyagokkal jelöltük. A *Wnt1+* sejtek bél falon belüli vándorlása (69. ábra, L) és a kollagén XVIII koexpressziója is szépen kirajzolódik (69. ábra, M, N). Nagy felbontású konfokális felvételek azt igazolják, hogy a csirke ENCC-khez hasonlóan, a postnatalis egérből származó bélidegrendszeri sejtek is képesek kollagén XVIII-at (69. ábra, O) és agrint (69. ábra, P) termelni.

Ezután megvizsgáltuk, hogy a posztnatális bélben melyik bélidegrendszeri sejt típus (glia, neuron) képes HSPG molekulákat termelni. Ehhez a kísérlethez *Plp1<sup>GFP</sup>* (minden enterális glia zöld fluoreszcenciával jelölt) és *Tau<sup>GFP/+</sup>* (minden enterális neuron fluoreszcenciával jelölt) transzgenikus egerek vékony és vastagbél bélidegrendszeréből létrehozott idegi sejtaggregátumokat tenyésztettünk. A disszociáltatott idegi sejtaggregátumokból fibronectinnel borított felszínen 4 nap alatt komplex neuron és glia hálózat fejlődött ki. Kettős immunfluoreszcens festések igazolták, hogy a *PLP1+* gliasejtek kollagén XVIII-at és agrint is expresszálnak (70. ábra, A-C''), míg a *Tau+* enterális neuronok csak agrint termelnek (70. ábra, D-G)



**69. ábra: Az enterális ganglionléc-eredetű sejtek kollagén XVIII-at és agrint termelnek. A.)** E11.5 egér embryo ganglionokat nem tartalmazó utóbelét E3 csirke embryo testüregébe transzplantáltuk. 9 nap elteltével a transzplantált bélszakasz **(A)** egér specifikus RET ellenanyaggal nem festődik, **(B)** a csirke neuronra specifikus CN expresszió alátámasztja a graft bélidegrendszerének csirke eredetét. **C-F.)** A sorozatmetszeteken csirke eredetű ENCC-k és **(C)** szintén a fogadó embryoból származó MEP21+ endothel sejtek láthatóak. A **(D)** kollagén XVIII, **(E)** az agrin és **(F)** a perlekán csirke specifikus ellenanyag festődése az egér graftban megjelenő HSPG-ok csirke eredetét igazolja. A **(D)** ábra felső részén kinagyítva egy myentericus ganglion látható. **E.)** Nyilak a fogadó embryoból származó erek által expresszált agrint jelölik. **(G)** 3 hetes *Wnt1;tdT* egér béltraktusából izolált **(H)** *Wnt1*+, **(I)** *p75*+ és **(J)** *HU*+ idegi sejtaggregátumokat E5 csirke embryo **(K)** coecumába ültetettük (nyilak) és 9 napig CAM membránra tenyésztettük. **L-N.)** A CAM tenyésztés ideje alatt a *Wnt1*+ sejtek a bélfal mentén vándoroltak és egér eredetű kollagén XVIII-at termeltek. A *Wnt1*+ sejtek egér specifikus **(O)** kollagén XVIII-cat és **(P)** agrint expresszálnak.





**70. ábra:** Az enterális glia kollagén XVIII-at és agrint is expresszál. **A.)** Posztnatális *Plp1<sup>GFP</sup>* egérből származó glia sejtek (**B-B''**) kollagén XVIII-at és (**C-C''**) agrint egyaránt kifejeznek. **D-G.)** A *Tau<sup>GFP</sup>* egérből előállított sejtenyészetekben (**D-D''**) a Tau+/HU+ enterális neuronok (**F**) agrint expresszálnak, de (**G**) kollagén XVIII-at nem fejeznek ki.

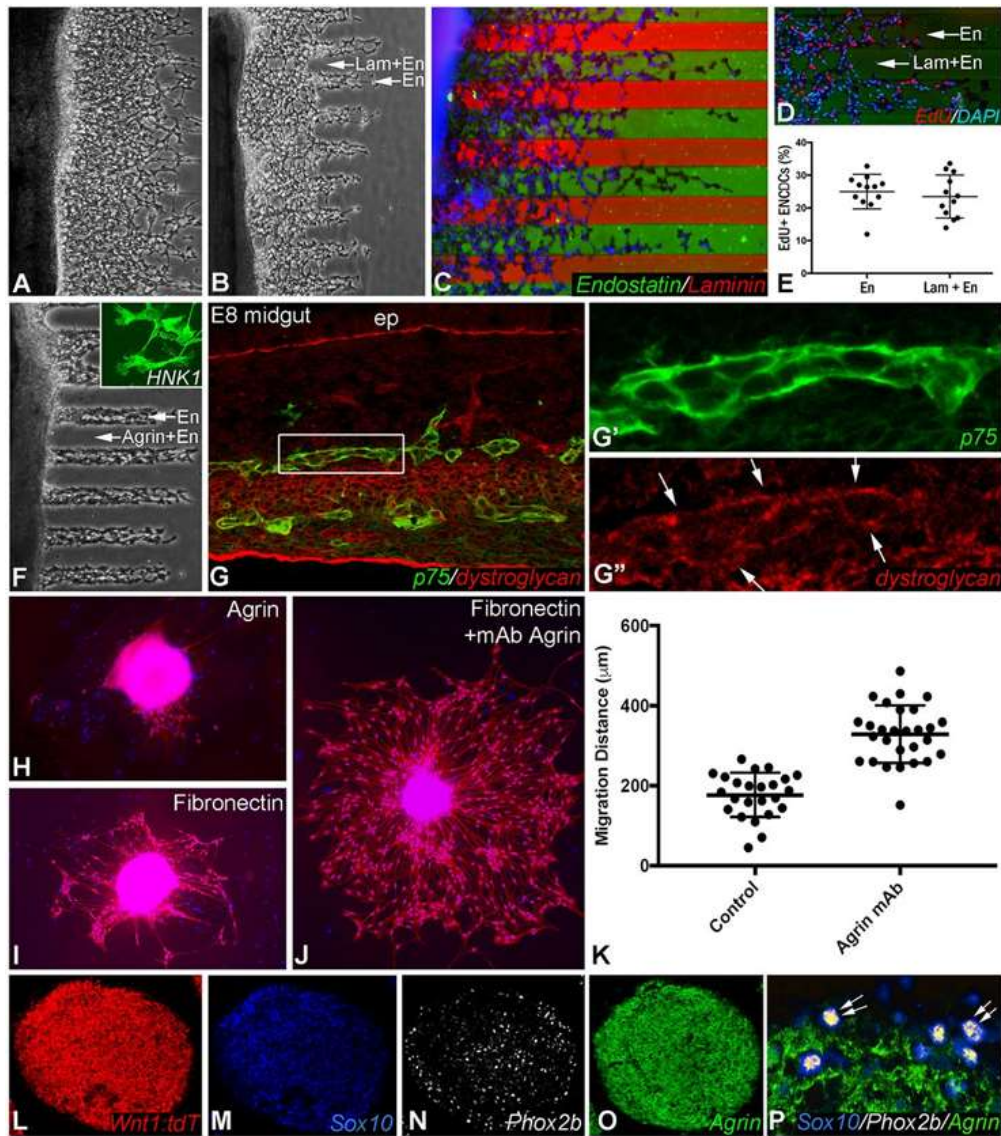
#### 4.9.4. Az agrin és a kollagén XVIII hatása az enterális ganglionléc-eredetű sejtek vándorlására.

Az agrin és kollagén XVIII ENCC-re kifejtett hatását *in vitro* sejtmigrációs („stripe-choice assay”) kísérletekben vizsgáltuk. 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 a fibronectinnel, illetve lamininnel együtt bevont sávokon (71. ábra, A). Az endostatinnal bevont felületen az ENCC-k távolabb vándoroltak a kiültetett bétől

(71. ábra, B, C), mint laminin+endostatin kezelt felszínen (71. ábra, B). A laminin és endostatin specifikus immunfestése kirajzolja a sávok molekuláris tulajdonságait (71. ábra, C). Az EdU alapú proliferációs teszt nem mutatott szignifikáns különbséget az endostatin felszínen vándorló sejtek proliferációjában (71. ábra, D). A sejt vándorlást megengedő endostatinnal szemben az agrin gátolta az ENCC-k vándorlását (71. ábra, F).

Az agrin molekulának 2 sejt felszíni receptora ismert: MUSK és dystroglycan (Winder 2001, Zong és Jin 2013). A MUSK receptor csak az intestinális simaizom sejteken mutatható ki, dystroglycant viszont a simaizom és epithel sejtek mellett, az ENCC-k is kifejezik (71. ábra, G-G"). Amikor a *Wnt1;tdT* egérből származó idegi sejtaggregátumokat agrinnal bevont felszínen tenyésztettük, az embryonális ENCC-khez hasonlóan a postnatalis idegi sejtaggregátumokból sem tapasztaltunk ENCC kivándorlást (71. ábra, H). A fibronectin felszínen kifejezett sejt vándorlás figyelhető meg (71. ábra, I). Ha az idegi sejtaggregátumokat fibronectinnel bevont felületen agrint blokkoló ellenanyag jelenlétében tenyésztettük, a sejtek migrációs távolsága jelentősen megnövekedett (71. ábra, J). Kontroll tenyészetben (az idegi sejtaggregátumokat csak fibronectin bevonaton tenyésztve) a ganglionléc-eredetű sejtek  $177 \pm 55 \mu\text{m}$ -t vándoroltak, míg agrint blokkoló ellenanyag jelenlétében  $329 \pm 72 \mu\text{m}$ -re jutottak, ami 86%-os növekedés jelentett (71. ábra K,  $P < 0,0001$ , Student's *t*-teszt). Az idegi sejtaggregátum tenyészetekből nem derül ki, hogy az agrin gátló hatása pontosan melyik sejten érvényesül. *Wnt1;tdT* egérből származó idegi sejtaggregátumokból készült metszeteken SOX10 és PHOX2b kettős immunjelölés alapján azonosítani tudtuk a differenciálatlan, progenitor sejteket. Kimutattuk, hogy a PHOX2b+/SOX10+ kettősen pozitív sejtek nem expresszáltak agrint (71. ábra, L-P), viszont a PHOX2b+/SOX10- neuron és a PHOX2b-/SOX10+ glia prekursorokat intenzív agrin expresszió jellemzi. Az agrin gátlása tehát nem a differenciálatlan progenitorok, hanem elsősorban a vándorlási potenciáljukat megtartó, elkötelezett prekurnak idegi sejtaggregátumokból történő kivándorlását fokozta.





**71. Ábra: Az agrin gátolja az enterális ganglionléc-eredetű sejtek vándorlását.** E7 csirke emryo középbelét 24 órán keresztül, különböző ECM fehérjékkel bevont felszínen tenyésztettük. **A.)** Az ENCC-k az endostatinnal, valamint az endostatinnal és fibronectinnel bevont sávokon egyaránt jól vándoroltak. **B.)** A csak endostatin felületű sávokon a sejtek messzebbre jutottak, mint az endostatint és laminint egyaránt tartalmazó sávokon. **C.)** A laminin és endostatin specifikus immunfestés kirajzolja a sávok helyzetét (zöld, endosztatin; piros, endosztatin és laminin együtt). **D, E.)** Az ENCC-k proliferációját EdU teszt segítségével vizsgáltuk. **F.)** Az endostatinnal borított sávokon az ENCC-k jól vándoroltak, míg agrin gátolta a sejt vándorlást (kinagyítva HNK1+ ENCC-k). **G.)** Az agrin enterális ganglionléc-eredetű sejtekre kifejtett gátló hatása feltehetően a sejtek disztroglikán expresszióján keresztül valósul meg [(G') és (G'')] ábra a (G) bekeretezett területe kinagyítva, nyilak az enterális ganglionok disztroglikán expresszióját jelölik]. **(H)** A *Wnt1;tdT*-eredetű idegi sejtaggregátumok agrinnal borított felszínen történő tenyésztése során, az enterális ganglionléc-eredetű sejtek nem vándoroltak ki. **(I.)** A fibronectinnel borított felszínen a sejtek jól vándoroltak, **(J-K)** agrin funkciót blokkoló antitest jelenlétében pedig még nagyobb migrációs távolság figyelhető meg. **(L-P)** A SOX10+/PHOX2b+ kettősen immunpozitív sejtek agrin expressziójának hiánya igazolja, hogy a *Wnt1;tdT* idegi sejtaggregátumokban található enterális ganglionléc-eredetű progenitor sejtek nem termelnek agrint (nyilak). En, endostatin; ep, epithelium; Lam, laminin. Az **(E)** és a **(K)** grafikonon középső és szélső sávjai az átlagot, valamint az SD értékeket jelölik.

## 5. Eredmények megbeszélése és konklúzió

Az elmúlt pár évtizedben sok adat gyűlt össze a bélidegrendszer morfológiájával és működésével kapcsolatban, de viszonylag kevés információval rendelkezünk a bélidegrendszer embryonális fejlődéséről és a veleszületett neurointesztinális megbetegedések kialakulásának mechanizmusáról. A bélidegrendszert érintő fejlődési rendellenességek közül a hypoganglionózissal vagy hyperganglionózissal és ectopicus ganglionok megjelenésével együtt járó intesztinális neurondiszpláziák és az aganglionózissal jellemzett Hirschsprung-kór a leggyakoribb veleszületett betegség (Friedmacher és Puri, 2013; Schäppi és mtsai., 2013) Az intesztinális neurocristopathiák genetikai hátterében bizonyítottan nagy szerepük van a GDNF, EDN3, és a BMP-4 mesenchymális faktorok jelátvitelében fellépő genetikai elváltozásoknak, ugyanakkor gyakran felvetődik az erekhez-, simaizomszövethez-asszociált extracelluláris mátrix vagy a bél epitheliumból származó morfogének (Netrin, Sonic Hedgehog) fejlődést szabályozó szerepe is (Nagy és Goldstein, 2017).

Ahhoz, hogy megértsük a veleszületett betegségek etiológiáját, a genetikai és molekuláris kölcsönhatások mellett, részletesen ismernünk kell a bélidegrendszer fejlődését, amelynek feltáráshoz - egymást kiegészítve - a zebrahal, egér (Ganz, 2018; Wallace és Burns, 2005; Wang és mtsai., 2011) és csirke (Goldstein és Nagy, 2008) embryokon végzett kísérletek nagymértékben járultak hozzá. A madár embryo a fejlődéstani kísérletek klasszikus modellrendszere, amiben először írták le és igazolták embryomanipulációval a ganglionléc sejtek létezését, differenciálódását. Mindezek ellenére, a madár bélidegrendszer fejlődésének kutatásával kapcsolatos munkákat jelentősen megnehezíti a rendelkezésre álló enterális neuron, glia és a ganglionlécből származó őssejtek azonosítására alkalmas specifikus reagensek korlátozott száma, valamint az utóbél idegrendszer fejlődési lépésének hiányos jellemzése. A HNK-1 (CD57) nevű ellenanyag, amely az emlősök (ember, patkány) és a madár ganglionléc-eredetű sejtjeinek megjelölésére leggyakrabban használt markere, csirke embryóban az ENCC-ken kívül, kiemelten a coecumban és a colorectumban, jellegzetes mesenchymalis festődést is mutat (Luider és mtsai., 1992), ami korlátozza korai az ENCC-k megbízható azonosítását.

**5.1. A vastagbél idegrendszerének embryonális fejlődése a madár embryóban.**

Kísérleti munkánk során első lépésben a HNK1 immuncitokémiai jelölést ötvöztük transzgenikus GFP (green fluorescent protein) csirke embryok vagus régióból származó velőcső+ganglionléc transzplantációjával. A velőcsőkimérák kettős jelölésével az ENCC-k utóbél mentén történő vándorlását tudtuk nyomon követni, s ezzel részletesen jellemeztük a fejlődő vastagbél idegrendszerének ontogenezisét. A GFP-csirke és csirke embryok micromanipulációjának számos fontos előnye van az általánosságban használt csirke-fürj embrionális kimérákkal szemben. A fürj embrionális fejlődése rövidebb (17 inkubációs nap), ezért nehezebben lehet a két fajból származó embryot azonos stádiumnak megfelelően rekombinálni. A fürj sejteket jelölő QCPN ellenanyag a sejtmagban található fehérjét ismeri fel. Ezzel szemben, a citoplazmatikus GFP expresszió az egész ENCC-ben megfigyelhető, beleértve a sejttestet és annak nyúlványait, ami jelentősen megkönnyíti az ENCC-k migrációjának vizsgálatát és differenciálódási, illetve eloszlási mintázatának részletes elemzését immunhisztokémia nélkül is.

A gerinces állatokra és az emberre is igaz, hogy a bélidegrendszert létrehozó ENCC-k többsége a velőcső vagus szakaszának ganglionléc sejtjeiből származik, amelyek caudális irányba haladva a teljes béltraktust kolonizálják. A humán embryogenezis során az ENCC-k a 7. héten érik el az utóbél proximális szakaszát (Fu és mtsai., 2003; 2004a; Wallace és Burns, 2005), ez a folyamat egér embryóban a 11,5. embrionális napon (Young és mtsai., 1998; Druckenbrod és Epstein, 2005), a csirkében a 6,5. embrionális napon (Burns és mtsai., 2002) következik be. Az utóbél kolonizációja egérben (McKeown és mtsai., 2001) és csirkében is 3 nap alatt befejeződik. Egyes gerinces fajokban két ganglionált plexus alakul ki a vastagbélben, amelyek eltérő fejlődési mintázattal rendelkeznek. Az ember, patkány és az egér embryok colorectumában először a myentericus plexus, később a submucosalis ganglionok alakulnak ki; humán embryokban a plexus submucosus a 14. embrionális héten (Fu és mtsai., 2004a) jelenik meg, míg egerekben és patkány embryokban csak a születés táján, illetve közvetlenül postnatálisan fejlődik ki (McKeown és mtsai., 2001). Ezzel szemben, a madárembryok utóbél szakaszában a plexus submucosus fejlődik ki először és néhány órával megelőzi a plexus myentericus fejlődését. Az utóbél distalis része olyan ENCC-ket is tartalmaz, amelyek a velőcső sacralis régiójából származnak (Kapur, 2000b; Burns és Le Douarin, 1998), de az a folyamat, ahogyan a különböző területről származó ganglionléc sejtek kolonizálják az utóbelet, illetve létrehozzák az első glia és neuron elemeket csak részben ismert.

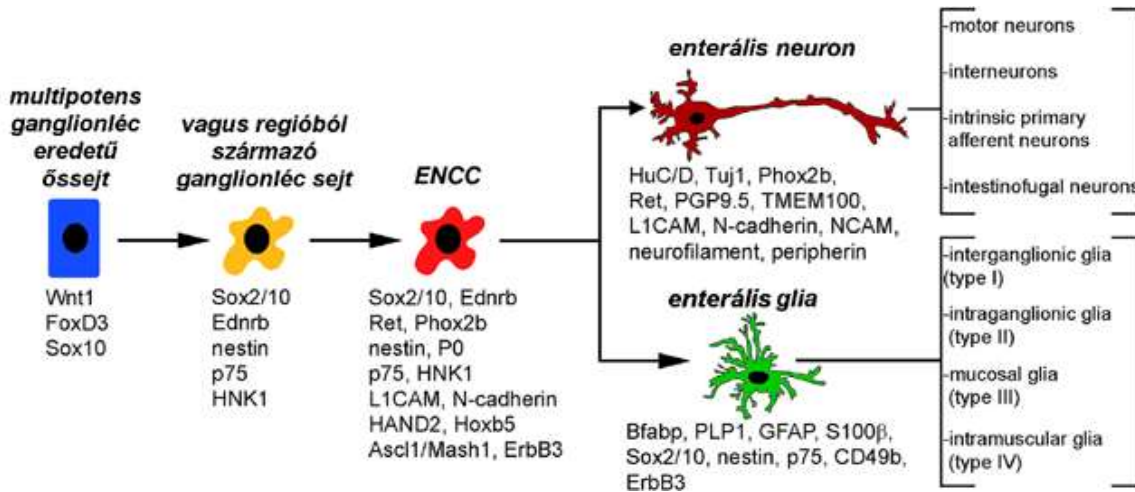
Részletes immuncitokémiai analízissel kimutattuk, hogy az E6.5 (HH29) stádiumú csirke post-coecalis utóbélszakaszát kolonizáló differenciálatlan ganglionléc sejtek HNK-1, p75, SOX10, N-cadherin, és L1CAM faktorokat fejeznek ki. Az eredmények komparatív embryológia összehasonlításával igazoltuk, hogy az ENCC-ket jelölő immuncitokémiai expressziós mintázat nagyon hasonlít az egérben vándorló ENCC-k fenotípusához (Anderson és mtsai., 2006a; Gershon és mtsai., 1993; Uesaka és mtsai., 2016; Young és Newgreen, 2001). Azt találtuk, hogy a felsorolt öt molekula a legelő haladó ENCC-ben szelektíven kifejeződik. Velünk egyidőben, Hackett-Jones és mtsai., (2011) is kimutatták, hogy az L1CAM és az N-cadherin neuronális sejtadhéziós molekulák a fürj ENCC-ken expresszálódnak.

A neuronális differenciálódást, amely a vándorláshoz hasonlóan caudális irányt követ, pan-neuronális HuC/D ellenanyaggal mutattuk meg, amely a 7. embryonális napon a proximális utóbélben fejeződik ki, 12 órával a differenciálatlan ENCC-k megérkezése után. Később, a differenciálódási hullám gyors előrehaladásával, a HuC/D molekula kifejeződése mindkét neurális plexusban megfigyelhető; E8-ra eléri el a distalis utóbelet, hasonlóan a Fairman és munkatársai által 1995-ben leírt differenciálódási mintázathoz. A Tuj1 és a CN ellenanyagok korai specifikus markerek a fejlődő bélidegrendszerben zajló neuronális differenciáció nyomonkövetésére. Az NCAM egy késői neuronális marker, amely először az E8 korban jelenik meg a proximális utóbélben, annak ellenére, hogy korábban erősen expresszálódik a Remak-ganglionban. Neurofilamentum expresszió csak az E8 után fordul elő az utóbélben. A gliális differenciáció hasonló mintázatot követ; a glia fenotípust a gliasejtek és azok prekursorait jelölő B-fabp-vel tudtuk kimutatni (Kurtz és mtsai., 1994). A B-fabp E7-on fejeződik ki a proximális utóbélben, majd E8-tól kimutatható az utóbél teljes hosszán. Ezzel szemben, a GFAP expresszió ebben a stádiumban hiányzik a ganglionokból, ahol először E10-tól a colorectum mindkét plexusában jelenik meg.

A colorectális ENS kialakulásakor azonosítottuk egy korábban nem ismert „harmadik plexust”, amely a belső submucosában lokalizálódik az epitheliumhoz közel. Ez a plexus csak átmenetileg van jelen a bélidegrendszer fejlődése során és rendszerint differenciálatlan marad ahol ritkán találunk benne HU+ sejteket. Hasonló belső submucosális ganglionsejteket leírtak 20 hetes humán magzati bélben is (Fu és mtsai., 2004a). A harmadik plexus kialakulásának lehetséges magyarázatát Zhang és munkatársai (2010) adják, akik matematikai modellezéssel

kapott eredmények alapján azt sugallják, hogy amikor az egyik plexus eléri a maximális sejtsűrűséget, a sejtek kis helyen való tömörülése megkönnyíti a másik plexus felé történő mozgást (Zhang és mtsai., 2010). A madarakban a belső submucosális plexus átmeneti jellege tükrözheti olyan szignálok hiányát a mesenchymában, amely az említett sejtek fenntartásához szükségesek. Emlősökön, beleértve az embert, a sertést, a lovat és a szarvasmarhát megfigyelték, hogy két-három különálló submucosális plexus is ki tud alakulni a submucosális terület különböző rétegei között (Balemba és mtsai., 1999; Timmermans és mtsai., 2001; Wedel és mtsai., 1999).

Mindezek alapján a következő modellt javasoljuk az ENCC differenciálódásának karakterizálásához: a HNK-1, p75, SOX10 és az N-cadherint differenciálatlan ENCC-ek fejezik ki és az idegsejtekben, vagy a gliában a differenciálódás után is expresszálódnak (Nagy és mtsai., 2007, 2012). 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 (72. ábra), hasonlóan az egér embryóban megfigyelt expressziós mintázatához (Young és mtsai., 2004).



72. ábra: ENCC-k differenciálódása.

**Összefoglalás:** a részletes immuncitokémia karakterizálásból kapott eredmények megerősítik a bélidegrendszer fejlődésének hasonlóságát a madár és a rágcsáló embryók között és vezérfonalként szolgál a madár bélidegrendszer fejlődését célzó kísérletekhez.



## 5.2. Plexus pelvicusból származó ganglionléc-eredetű sejtek részt vesznek a vastagbél idegrendszerének fejlődésében.

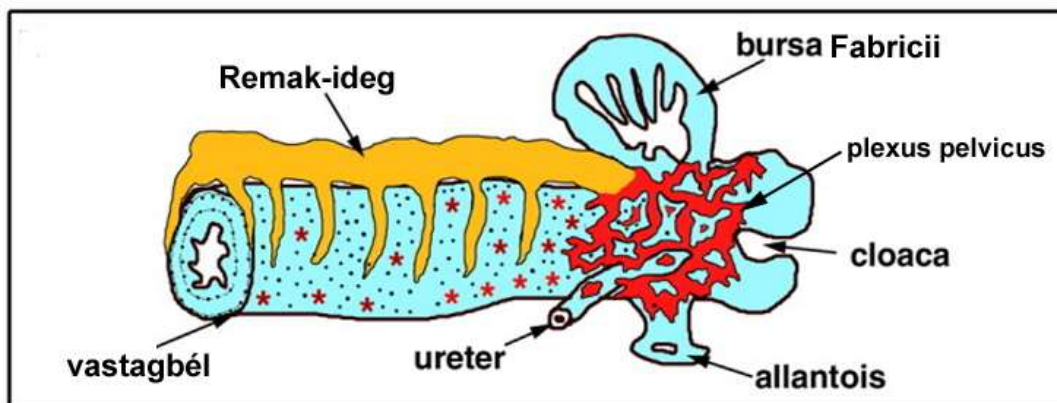
A következő kísérletsorozat célja az volt, hogy meghatározzuk a Remak-ganglion és a plexus pelvicus hozzájárulását az utóbélben fejlődő idegrendszer kialakulásához. Csirke és egémbryokon végzett micromanipulációs kísérletek korábban kimutatták, hogy a sacralis ganglionlécből származó sejtek szintén részt vesznek az utóbél beidegzésében (Anderson és mtsai., 2006a; Burns és mtsai., 1998; Catala és mtsai., 1995; Erickson és Goins, 2000; Kapur, 2000a; Le Douarin és Teillet, 1973b; Margarido és mtsai., 2020; Pomeranz és Gershon, 1990), de a régióból érkező ganglionléc sejtek (csirkében a 25., egérben 24. szomitától caudálisan, ami felnőttben a lumbális L1-2 csigolyáknak megfelelő szakasz) pontos migrációs útvonala, differenciálódása nem tisztázott. *Gdnf*, *Gfra1* vagy *Ret* null-mutáns egerekben a vagus eredetű ganglionlécből származó sejtek nem képesek kolonizálni a vékonybél és a vastagbél szakaszait (Cacalano és mtsai., 1998; Enomoto és mtsai., 1998; Moore és mtsai., 1996; Pichel és mtsai., 1996; Sánchez és mtsai., 1996; Schuchardt és mtsai., 1994; Tomac és mtsai., 2000). Ezeknek a mutáns egereknek a distalis utóbelében azonban kevés neuron mindig elfordult (Durbec és mtsai., 1996; Cacalano és mtsai., 1998), ami valószínűleg a sacralis ganglionléc sejtekből származott. A Remak-ganglion egy sacralis ganglionléc-eredetű struktúra, amely a madár közép- és utóbél mesenteriumában helyezkedik el. A Remak-ganglion egy nagyméretű ganglionizált idegtörzs, amely sympaticus és a parasympaticus nyúlványokkal látja el a distalis béltraktust (Aisa és mtsai., 1998; Teillet, 1978) így a vagus ideg mellett, a bél extrinsic autonóm beidegzésének alkotóeleme. Szintén ide tartozik a plexus pelvicus, ami a cloaca körül található olyan komplex neuronális hálózat, amely sympaticus és parasympaticus rostokkal látja el a medencei zsigereket. Madarakban a plexus pelvicus a Remak-ganglion caudalis végének folytatásaként a bursa Fabricii és a cloaca szomszédságában helyezkedik (Aisa és mtsai., 1998; Catala és mtsai., 1995).

Csirke-fürj kimérák felhasználásával Burns és Le Douarin (1998) olyan fürj eredetű neuronokat talált, amelyek a Remak-ganglionból kinövő idegrostok mentén, amiből arra következtettek, hogy a sacralis ganglionlécből származó sejtek először a Remak-gangliont kolonizálják, majd útjukat folytatva a kinövő idegrostok mentén vándorolnak és másodlagosan lépnek a csirke bél falába. A sacralis ganglionléc sejtek caudalis-rostralis gradiensnek megfelelően járulnak hozzá az utóbél idegrendszerének kialakulásához; maximális arányban a

distalis colorectumban fordulnak elő, ahol a myentericus neuronok 17%-a származik a sacralis ganglionlécből, míg a rostralis colorectum területén a neuronok csak 0,3%-a sacralis eredetű. Ez a gradiens egy lehetséges cloaca szintjéről induló cranialis irányú migrációra is utal. Ugyanez merült fel emlős embryokban is, ahol Kapur (2000) transzgenikus egérmodellt használt annak bemutatására, hogy a sacralis ganglionléc-eredetű sejtek először a plexus pelvicus területére vándorolnak, majd később rostrális irányba mozognak, hogy hozzájáruljanak az utóbél ENS-ének kialakulásához (73. ábra).

Embyromanipulációs vizsgálatokból kapott eredményeink kísérletesen alátámasztják Kapur (2000) megfigyelését, azaz a madár plexus pelvicus részt vesz az utóbélben található ENS kialakulásában. Embryomanipulációs körülmények között a transzplantált utóbél graftok csak akkor rendelkeztek neuronális sejtekkel, ha a graftok cloaca és a pericloacalis mesenchymát is tartalmaztak. Burns és Le Douarin (1998) megállapításaival összhangban kevesebb sejt volt látható a proximális utóbélben és a submucosális régióban. Cloacát nem, de Remak-gangliont tartalmazó utóbél graftokban számos extrinsic idegrost fejlődött, amelyek a Remak-ganglionból a bél mesenchymájába nyúlnak. Remak-gangliont tartalmazó utóbél CAM-tenyésztetei nem mutattak a Remak-ganglionból származó neuronokat a transzplantált bélben még akkor sem, ha a vagus-régióból kiinduló ganglionléc sejtek már jelen voltak a bélfalban. Ugyanakkor, a Remak-ganglionból induló kiterjedt neurofilamentum pozitív rostokat lehetett megfigyelni, összhangban a Remak-ganglionnak a bél külső innervációjában betöltött szerepével (Aisa és mtsai., 1998; Shepherd és Raper, 1999). Az **utóbél+cloaca CAM graftokban** a plexus pelvicusból származó enterális ganglionokat mutattunk ki a distalis colorectumban, amelyek kicsik és szétszórtak voltak, csak töredék részét képezték a normál bélidegrendszernek. Bélcső-velőcső rekombinációk alkalmazásával Hearn és Newgreen (2000) megfigyelték, hogy a sacralis eredetű ganglionlécsejtek csak kevés, kisméretű gangliont képeznek. Hasonlóképpen, a vagus régió velőcső ablációt követően a sacralis eredetű sejtek kicsi és ritka ganglionokat képeznek (Burns és Le Douarin, 2001). Mindez egyértelműen igazolja, hogy a vagus és a sacralis ganglionlécből származó enterális neuronok migrációs és fejlődési potenciálja nyilvánvalóan nem egyenértékű. A vagus versus sacralis velőcsőből származó ganglionléc sejtek közti fejlődési különbségre a csirke-fürj velőcső kimérák is rávilágítottak. Amikor a vagus régióból származó ganglionlécet átültették a sacralis területre, a vagus eredetű sejtek sokkal nagyobb számban léptek be az utóbélbe,

ami a colorectális ganglionok közel normális fejlődését eredményezte (Burns és mtsai., 2002), tehát a vagus régióból származó sejtek megtartották fejlődési potenciáljukat. Később ugyanez a kutatócsoport négyszer magasabb *RET* expressziót mutatott ki a vagus régióból jövő ganglionléc sejteken, ami az intenzívebb migrációt magyarázhatja. Ez volt az első genetikai adat, ami igazolta, hogy a vagus és sacralis velőcső-eredetű ganglionléc sejtek eltérő migrációs és differenciálódási háttérrel rendelkeznek.



73. ábra: Sacralis velőcsőből származó ganglionlécsejtek a plexus pelvicuson területén (piros szín) áthaladva kolonizálják a distalis utóbelet.

**Összefoglalás:** a plexus pelvicusához tartozó ganglionokból, és nem a Remak-ganglionból származnak a distalis utóbelet benépesítő ganglionléc sejtek. Ez a megfigyelés összhangban áll Teillet (1978) adataival, aki kimutatta, hogy a Remak-ganglionnal együtt tenyésztett ganglionmentes utóbélben csak akkor alakultak ki adrenerg neuronok, ha az cloacát is tartalmazott, továbbá összhangban állt Kapur adataival is (2000), amelyek szerint aneuralis egér utóbélben nem alakultak ki enterális neuronok, kivéve, ha a szomszédos pelvicus ganglionokat tartalmazó perirectalis mesenchyma is jelen volt. Madárembryokkal végzett kísérleteink (Nagy és mtsai., 2007) alapján megismételt egéren végzett kísérletek (Wang és mtsai., 2011) egybehangzóan igazolták, hogy a sacralis ganglionlécéből származó sejtek a plexus pelvicuson keresztül jutnak a distalis utóbélbe. Az utóbél idegrendszerével kapcsolatos további vizsgálatok és sacralis ganglionlécéből származó sejtek hozzájárulásának részletes karakterizálása fényt deríthetnek a Hirschsprung-kór és más vastagbél specifikus neurointesztinális rendellenességek kezelésére.

**5.3. EDN3 serkenti a ganglionléc sejtek proliferációját, gátolja a GDNF indukált differenciálódást, és biztosítja a ganglionléc sejtek vastagbélbe történő bevándorlását.**

Annak ellenére, hogy az EDN3 jelátvitel szerepe a bélidegrendszer fejlődésében jól meghatározott, a folyamat háttérében álló fejlődési mechanizmusok, molekuláris kölcsönhatások még mindig tisztázatlanok (Barlow és mtsai., 2003b; Baynash és mtsai., 1994; Hosoda és mtsai., 1994; Kruger és mtsai., 2003; Woodward és mtsai., 2003). A leginkább elfogadott hipotézis szerint az EDN3 jelátvitel fenntartja a ganglionléc eredetű őssejtpopulációt, biztosítja proliferációs képességüket és meggátolja neuronális irányba történő differenciációjukat. Az EDN3 hiánya tehát korai neuronális differenciációhoz vezet, amelynek következtében a magas migrációs képességgel rendelkező differenciálatlan őssejt populáció kimerül még a béltraktus teljes kolonizációja előtt. Az a megfigyelés, miszerint EDN3-deficiens egerekben a ganglionmentes bélszakasz az utóbélre lokalizálódik arra enged következtetni, hogy EDN3 szignalizáció hiányában csak annyi ganglionléc eredetű őssejt áll rendelkezésre, amely a béltraktus coecumig tartó régióját képes kolonizálni. Az EDN3 szignalizáció tehát specifikus hatással lehet a migráló ganglionléc eredetű sejtekre, hogy ezek elérhessenek a coecum szintjére. A szignalizáció hatására a prekursor sejtpopuláció expanziója figyelhető meg, amely lehetővé teszi az utóbél egészének kolonizálását. Madarakon végzett megfigyeléseink, illetve rágcsálókban végzett kísérletek együttesen igazolják, hogy a coecum központi szerepet tölt be az EDN3 szignalizációban (Lee és mtsai., 2003; Nagy és Goldstein, 2006a; Shin és mtsai., 1999; Sidebotham és mtsai., 2002; Woodward és mtsai., 2000). Az EDN3 növekedési faktor egerekben csak a E10.5-E12.5 napok közt elengedhetetlen, amikor a legelől haladó vándorló ganglionléc eredetű sejtek az ileo-coecalis területen lépnek épp át a proximális utóbél területére. Az *Edn3* és *Ednrb* mutáció hatására a neurális ganglionléc eredetű sejtek migrációja normálisan lezajlik egészen a coecum szintjéig, ahol feltehetőleg egy átmeneti migrációs gátba ütköznek. (Druckenbrod és Epstein, 2005b; Druckenbrod és Epstein, 2009; Kapur és mtsai., 1992; Kapur és mtsai., 1995; Lee és mtsai., 2003)

Az *EDN3* és *GDNF* növekedési faktorok expressziós mintázatát *in situ* hibridizációval vizsgálva megfigyeltük, hogy az egér embryohoz hasonlóan (Leibl és mtsai., 1999; Young és mtsai., 2001) mindkét gén a coecum szintjén expresszálódik. A coecalis *EDN3* expresszió azonban átmeneti, csirke embryóban csak az embryonális fejlődés 5. napja előtt figyelhető

meg. Éppen ez a tranziens expresszió (Nataf és mtsai., 1998) lehet az oka annak, hogy ez a jelenség korábban nem volt ismert. A *GDNF* expressziója szintén kiemelkedően magas a coecum szintjén. Mindkét gén coecum kezdeményekre lokalizálódó expressziója pontosan a vándorló ganglionléc eredetű sejtek érkezése előtti stádiumra tehető (Newgreen és mtsai., 1996), ami arra utal, hogy ezen faktorok lokálisan, közvetlen vagy közvetett módon befolyásolják a vándorló ganglionléc eredetű sejteket.

Testüreg kimérák létrehozásával azt az érdekes megfigyelést tettük, hogy az első ganglionléc eredetű sejtek (melyek elérik a coecum utáni, ún. post-coecalis régiót az embryonális fejlődés 5. és 6. napja között) elegendőnek bizonyulnak a teljes utóbél kolonizálására. Ezen eredmények két fontos tulajdonságát emelik ki a coecum szintjét elérő ganglionléc eredetű sejteknek: elsősorban egy speciális molekuláris mikrokörnyezetbe kerülnek, amely gazdag *EDN3* és *GDNF* faktorokban, másodsorban pedig a legelől haladó sejtek nagy proliferációs képességgel rendelkeznek és önmagukban képesek kialakítani az utóbél teljes bélidegrendszerét. Mivel mind az *EDN3*, mind a *GDNF* expresszió a neurális ganglionléc eredetű sejtek érkezése előtt legalább fél nappal megfigyelhető, ezen faktorok közvetett módon befolyásolhatják az érkező ganglionléc eredetű sejteket azáltal, hogy megváltoztatják a coecum mesenchymális mikrokörnyezetét.

Annak érdekében, hogy részletesen vizsgálni tudjuk az *EDN3-EDNRB* szignalizáció szerepét a madár utóbél idegrendszerében, kifejlesztettünk egy olyan embryomanipulációs technikát, amellyel *in vivo* is vizsgálni tudjuk a bélidegrendszer fejlődését. Testüreg kimérák létrehozása a madarak esetében egy jól bevált embryomanipulációs módszer, amelyet hatékonyan alkalmaztunk a végtagfejlődés (Hamburger, 1939), valamint a nyirokszervek (Nagy és Oláh, 2010; Nagy és mtsai., 2004; Nagy és mtsai., 2005) és a vérképző szövetek (Caprioli és mtsai., 1998) fejlődésének megértésére, a bélidegrendszer fejlődésének tanulmányozására azonban még ezt a módszert korábban nem alkalmazták. Preganglionáris fürj utóbél csirke testüregbe történő transzplatációja után azt találtuk, hogy a csirke ganglionléc eredetű sejtjei kolonizálják a transzplantált fürj utóbél szakaszt és két ganglionáris plexust hoznak létre, amelyek nagyon hasonlítottak a normál bélidegrendszer morfológiájához. A testüreg kimérák létrehozása lehetőséget ad a ganglionmentes utóbél molekuláris környezetének transzplantációt megelőző manipulációjára is. Ellentétben a chorioallantois membrán transzplantációs technikával, amely csak az embryonális fejlődés 8. napja után végezhető el,



testüreg kimérák létrehozása már egy 3 napos embryo esetében is megvalósítható, amely így hosszabb tenyésztési periódust tesz lehetővé. A fogadó embryo velőcső sejtjeinek fluoreszcens karbocianinnal (CM-Dil) történő jelölése igazolta, hogy a transzplantált utóbelet a fogadó embryo vagus régiójából származó ganglionléc sejtek kolonizálják (Nagy és Goldstein, 2006).

Testüreg kimérák létrehozásával azt találtuk, hogy az EDNRB szignalizáció gátlása az utóbélben súlyos hypoganglionózist okoz, míg az EDN3 túlzott kifejeződése hyperganglionózishoz vezet. Ez a számbeli különbségben észrevehető hatás a ganglion sejtek szintjén a ganglionléc eredetű sejtek proliferációs, túlélési és differenciációs képességében történő változásokra vezethető vissza. Az EDN3 túlexpressziója esetén szignifikánsan több osztódó sejtet találunk a kontrollhoz viszonyítva, az EDNRB-t gátló BQ788 reagens jelenlétében pedig nem figyelhető meg sejtosztódás. Ez a hatás azonban csak enterális ganglionlécsejtekre specifikus, hiszen ez a különbség nem figyelhető meg az epithelium vagy a mesenchyma szintjén. Ezt a megfigyelést korábbi *in vitro* kísérletek is alátámasztják, ahol kimutatták, hogy az EDN3 elősegíti a tenyésztett ganglionléc eredetű sejtek osztódását (Barlow és mtsai., 2003b; Hearn és mtsai., 1998; Lahav és mtsai., 1996; Stone és mtsai., 1997). Ugyanakkor az EDNRB szignalizáció gátlása esetén nem figyelhető meg fokozott apoptózis, amely egybeesik korábbi kísérletekkel, ahol EDNRB deficiens egerek bélidegrendszerének vizsgálata esetében is hasonló eredményekre jutottak (Lee és mtsai., 2003).

Az enterális ganglionléc eredetű sejtek proliferációs képességének indukálása mellett, az EDN3 megakadályozza a neurális irányú differenciálódást, amelyre az nNOS-t expresszáló neuronok hiánya ad magyarázatot. Az nNOS az első neurotranszmitter, amely megjelenik a differenciálódó enterális neuronokban (Branchek és Gershon, 1989). Ezek a terminálisan differenciálódott neuronok jelen vannak a BQ788-kezelt belek coecumában, tükrözve ezáltal a sejtek korai differenciációjának és migrációs képességének elvesztését. Ezzel párhuzamban, az EDN3-al kezelt utóbelekben megfigyelhető differenciált neuronok hiánya a ganglionléc eredetű sejtek elnyújtott proliferációjával és az utóbél teljes kolonizációjával együtt jelentkezik.

Az EDN3 növekedési faktor ganglionléc eredetű sejtek differenciálódására és migrációjára kifejtett hatása kiemeli a coecum bélidegrendszer fejlődését organizáló szerepét. A GDNF egy esszenciális chemoattraktáns molekula az enterális ganglionléc sejtek számára.

(Young és mtsai., 2001) Ez azonban felveti a kérdést, hogy a vándorló ganglionléc eredetű sejtek hogyan képesek átjutni azon a GDNF-ben gazdag bélszakaszon, ami a coecum magas GDNF expressziójának hatására alakul ki. Rágcsálókban végzett kísérletek eredményei azt sugallják, hogy az EDN3 modulálja a ganglionléc sejtek chemoattrakcióját a GDNF-fel szemben. Ez a feltevés ugyanakkor madarakban is igaz, hiszen az EDN3 gátolja a GDNF-fel szembeni chemoattrakció létrejöttét, ezáltal lehetővé teszi a ganglionléc eredetű sejtek migrációját a coecumon keresztül az utóbélbe. A mesenchymális BMP (Goldstein és mtsai., 2005) és epitheliális SHH (Fu és mtsai., 2004b) növekedési faktorokról ugyanúgy kimutatták, hogy képesek szabályozni a GDNF által kiváltott chemoattrakciót. Ezen információk együttesen azt sugallják, hogy az említett jelátviteli útvonalak között potenciális kölcsönhatás is felléphet, amelyek együttesen befolyásolják a bélidegrendszert kialakító sejtek migrációját. Ahogy a ganglionléc eredetű sejtek átjutnak a coecumon keresztül az utóbélbe, a GDNF elveszíti chemoattraktáns szerepét, amely az utóbélben lévő más chemoattraktáns faktorok jelenlétére utalhat.

Eredményeink rámutatnak az EDN3-EDNRB jelátvitel fontos szerepére az utóbélben is, ahol az EDN3 expresszió a bevándorló ganglionléc sejtek megjelenésével egyidőben indul el. A coecum jelenlétében történő EDNRB gátlás az utóbelet ganglionmentessé teszi. Ezzel szemben, a coecum kizárásával végzett kísérletekben (testüreg kimérák létrehozása), a ganglionléc eredetű sejtek eléri az EDNRB deficiens utóbél szintjét, azonban nagyon alacsony számban. A megfigyelt hypoganglionózis arra utalhat, hogy az EDNRB szignalizáció elengedhetetlen az utóbél normál enterális ganglionsejt populációjának kifejlődéséhez. Az EDNRB szignalizáció szükségessége az utóbél szintjén előzőleg végzett kísérletekkel összhangban van, melyek során Wu és munkatársai bebizonyították, hogy az *Ednrb*-deficiens egerek vastagbelének végső szakasza ganglionmentes marad egészen addig, amíg exogén EDN3 kerül a tenyésztő médiumba, amely elindítja a ganglionléc eredetű sejtek migrációját a ganglionmentes bélszakasz felé. Az elképzelés, miszerint az EDN3 nem csak az enterális ganglionléc eredetű sejt prekursor populáció fenntartását biztosítja, hanem elengedhetetlen szerepet tölt be maga az utóbél szintjén is, magyarázatot adhat arra, hogy a sacralis ganglionléc sejtek miért nem működnek jelentősen közre a distalis colorectum kolonizálásában EDN3- és EDNRB-deficiens egerek esetében (Baynash és mtsai., 1994; Hosoda és mtsai., 1994).

Ha a ganglionmentes bélszakasz kialakulása kizárólag a korai neuronális differenciáció és a migrációs képesség elvesztésének lenne a következménye, akkor azt várnánk, hogy a sacralis régióból származó ganglionléc sejtek a mutáns háttér ellenére is képesek pótolni a hiányt. Megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy a deficiens EDN3 jelátvitel olyan mikrokörnyezetet alakít ki az utóbélben, amely az enterális ganglionléc eredetű sejtek kolonizációja ellen hat és ez érvényes lehet a sacralis velőcsőből származó ganglionléc sejtekre is.

**Összefoglalás: madárembryokon végzett *in vivo* kísérleteinkkel először tudtuk igazolni, hogy az EDN3 jelátvitelnek összetett hatása van a bélidegrendszer fejlődésében; elősegíti az enterális ganglionléc eredetű sejtek proliferációját, gátolja a neuronális irányú differenciációt és modulálja a sejt migrációt.** Ezt a komplex fejlődési jelenséget később egérembryokkal végzett kísérletek is alátámasztották (Bondurand és mtsai., 2006; Druckenbrod és Epstein, 2009).

#### **5.4. A ganglionléc eredetű sejtek vándorlása, differenciálódása az endothél sejtek felszínén történik.**

Az ENCC-k meghatározott útvonalon vándorolva alakítják ki a bélidegrendszert, amely koncentrikus ganglionok rétegeiből áll a bél körkörös simaizom rétegének két oldalán. Azok a molekuláris kölcsönhatások, amelyek a bélidegrendszer kialakulása idején mintázatformáló hatással rendelkeznek, többnyire ismeretlenek. Eddig még egyetlen olyan morfogenetikus faktor sem került meghatározásra, amely szelektív expressziós mintázatot mutatva irányítaná az ENCC-k migrációját. Munkánk során egy fontos tér- és időbeli kapcsolatot tártunk fel az intesztinális kapillárisok fejlődése és a vándorló ENCC-k között. Jóval megelőzve az ENCC-k érkezését, az endothélsejtek két jellegzetes koncentrikus körben helyezkednek el a bél mesenchymában mintegy kijelölve az enterális ganglionok későbbi mintázatát. Kimutattuk, hogy madár és zebra hal embryokban a vándorló ENCC-k szoros kapcsolatban állnak a vérerekkel. Ez arra enged következtetni, hogy a vérerekből érkező jelzések szabályozzák a ganglionléc eredetű sejtek migrációját. A vérerek képződésének megakadályozása a bélben az ENCC-k migrációjának gátlásával járt, amelynek következtében ganglionmentes utóbél szakasz alakult ki, bizonyítva a vaszkularizáció fontosságát a bélidegrendszer fejlődésében.

Az endothél sejtek basális membránja potenciális migrációs felületnek számít az érkező ENCC-k számára. Korábban már kimutatták, hogy a velőcső, a szomiták és a myotom mentén a migráló ganglionléc-eredetű sejtek többször is kontaktusba kerülnek a basális membránnal, ami extracelluláris mátrixot alkotó komponensekben gazdag, és amely célzottan irányítja a ganglionléc-eredetű sejtek migrációját az organogenezis fázisaiban (Spence és Poole, 1994). Kísérletesen mi is megvizsgáltuk az endothél sejtek ENCC migrációt elősegítő képességét. Amikor ENCC-ket izoláltunk és változatos felületekre *in vitro* kihelyeztük (kezeletlen műanyag felület, laminin, fibronectin mátrixszal előkezelt felszín, vagy endotheliális és epitheliális sejtekkel bevont felület) akkor a ganglionléc eredetű sejtek kifejezetten erős migrációt mutattak a laminin és fibronectin felszínen, amelyekről ismert, hogy szubsztrátként szolgálnak a velőcsőből kilépett korai ganglionléc eredetű sejtek vándorlásához is. Ehhez hasonlóan, ha az ENCC-ket humán endothel sejtek által alkotott felületen tenyésztettük, akkor a kiültetett sejtek élénk migrációt mutattak, míg az epitheliális sejtek által alkotott felület nem volt megengedő a kivándorló sejtek számára. Ezen eredmények egybecsengenek a korábbi kísérleti eredményekkel, amelyek a vérerek szerepét hangsúlyozzák a velőcsőből kilépő korai ganglionléc sejtek migrációjának irányításában (Spence és Poole, 1994). Fontos megjegyezni, hogy a fibronectin és laminin felszínekhez képest az embryonális endothél sejt kultúrákban szignifikánsan több osztódás volt az ENCC-k szintjén, mint bármelyik ECM komponensen, felhívva a figyelmet arra, hogy az endothélsejtek más faktorokat is termelnek, amivel a migrációs és a proliferációs képesség fenntartását biztosítják.

Az endothél sejtek ENCC-re kifejtett hatása különböző molekuláris mechanizmusok (sejtfelszínen expresszált faktorok által vagy szekretált molekulák segítségével) következtében valósulhat meg. Ilyen lehet az artemin molekula, amely a vérerekben termelt neurotrofikus faktor. Az artemin elsősorban a szimpatikus neuronok fejlődésében vesz részt (Stewart és mtsai., 2008; Yan és mtsai., 2003). Az endothél sejtek mátrix metalloproteázokat szekretálnak, amelyek neuroblast migrációt képesek indukálni; vagy olyan egyéb neurotrofikus faktort (brain derived neurotrophic factor) termelnek, amely a neuronális migrációt és túlélést biztosítja. Az endotheliális sejtek által szekretált extracelluláris mátrix ugyanúgy fontos szereppel bírhat az ENCC-k számára. Ismerve az extracelluláris mátrix fontosságát a ganglionléc eredetű sejtek migrációjában és a bélidegrendszer fejlődésében megvizsgáltuk, hogy az ECM mediált interakciók fontosnak bizonyulnak-e az endothél sejt mediált

migrációjában. Ehhez a CSAT nevű monoklonális ellenanyagot használtuk, amely az integrin receptor beta-1 alegységéhez kötődve meggátolja a laminin, fibronectin és a kollagén IV felismerését, és amelyek mind kifejeződnek az endotheliális sejtek basalis membránjában (Chauss és mtsai., 2015; Hall és mtsai., 1987; Visconti és Hilfer, 2002). Kimutattuk, hogy a CSAT antigén intenzíven expresszálódik az ENCC-k felszínén. Továbbá megfigyeltük, hogy a CSAT ellenanyag az endothél sejteken tenyésztett középbélből kiinduló ENCC migrációra gátló hatással bírt. Ezek az eredmények alátámasztják azt a feltételezést, ami szerint az **ENCC-k felületén expresszált beta-1 integrinek elengedhetetlenül szükségesek az endothélsejtek által szekretált lamininben gazdag extracelluláris mátrixhoz történő kötődéshez, ezzel elősegítve az ENCC-k migrációját és proliferációját a fejlődő bélidegrendszerben.**

A bélidegrendszer fejlődése során az ENCC-k fibronectinben, lamininben, IV-es típusú kollagénben és tenascinban gazdag közegben vándorolnak. A bél extracelluláris milliójében a laminin az ENCC-k felületén expresszálódó laminin receptorhoz kötődik. Az ENCC-ECM kölcsönhatás fontosságát bizonyítja az *EDN3* mutáns egerekben megfigyelt colorectális aganglionózis kialakulása. A ganglionmentes régiók jelentkezése együtt jár a laminin túlzott felhalmozódásával az érintett régióban, amely korai neuronális differenciációhoz vezethet, meggátolva ezáltal a normál ENCC migrációt. Érdekes módon a laminin kötő fehérje nem egy integrin típusú molekula, így a CSAT nem befolyásolta. Ez arra enged következtetni, hogy integrin és nem integrin mediált interakciók együttesen szükségesek az ECM szintjén a bélidegrendszer fejlődésében. Abnormális laminin és kollagén IV expresszió korábban már leírásra került a humán Hirschsprung-kórral asszociáltan is. Döntő bizonyítéknak számít az ENCC-ECM interakció fontosságában az a nemrég végzett kísérlet, ahol a beta-1 integrinek célzott deléciója történt a ganglionléc eredetű sejtekben. A mutáns egerek jellegzetes distalis colorectális aganglionózist mutattak, de hogy miért korlátozódik a rendellenesség a distalis régióra, még nem tisztázott (Breau és mtsai., 2006; 2009).

**Összefoglalás: a vándorló ENCC-k felszínén jelen lévő integrinek és az endothél sejtekhez-asszociált ECM molekulák között fellépő kölcsönhatás kritikus fontosságú az ENCC-k migrációjában. Eredményeinket később számos kutatócsoport integrálta a bélidegrendszer és az endothél sejtek kölcsönhatását célzó kísérleteik során (Delalande és mtsai., 2015; Hatch és Mukoyama; Schrenk és mtsai., 2015).**



### **5.5. Az utóbél bélidegrendszerének mintázatához megfelelő simaizomfejlődés szükséges.**

Az ENCC fejlődését szabályozó mechanizmusok nem egészen érthetők, bár egyre több bizonyíték támasztja alá az ENCC-k és a bél mikrokörnyezete közötti kölcsönhatások fontosságát. Ide tartoznak az ENCC-k felszíni receptorai és a mesenchymában jelen lévő ligandok (Goldstein és mtsai., 2013), illetve az extracelluláris mátrix közötti kölcsönhatások (Akbareian és mtsai., 2013; Nagy és mtsai., 2016). Az erekhez hasonlóan az bél simaizom rétegei is szoros anatómiai kapcsolatban vannak a bélidegrendszer elemeivel, és a 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.

Zebrahal embryóban a simaizom és az enterális idegsejtek differenciálódása egyszerre zajlik; a simaizomfejlődést érintő mutációk bélidegrendszert érintő rendellenességeket eredményeznek (Wallace és mtsai., 2005). Ezzel szemben, csirke embryokban a gyomorban zajló simaizom differenciálódás mindig az ENCC-k kolonizációja után következik be. A gyomor kolonizációja előtt végzett ENCC ablatio hátráltatja a simaizom fejlődését (Faure és mtsai., 2015). Az emberi bélben a simaizomrétegek differenciálódása és az ENCC kolonizációja között specifikus embryológiai kapcsolat fennállása nem ismert (Fu és mtsai., 2004; Wallace és Burns, 2005).

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, mind a calponin, azaz a korai és a késői izom differenciálódásra jellemző molekulák expressziója az ENCC-k érkezése előtt megjelenik. Ennek eredményeként az E5 korú csirke embryokban a középbélben vándorló ENCC-k olyan differenciálatlan mesenchymális környezettel találkoznak, amelyben nincs simaizom, míg 2 nappal később az utóbelet kolonizáló legelől haladó ENCC-k a differenciált simaizomrétegek külső és belső felületén vándorolnak. Ez arra enged következtetni, hogy az ENCC-k jelenléte nem szükséges a

simaizom fejlődéséhez az utóbélben és ezt megerősítik az aganglionikus utóbelek CAM tenyészetében tapasztalható simaizom szövet kialakulása. Paradox módon az ENS migrációs hullámfrontja a középbelen tovább tud haladni, annak ellenére, hogy ott simaizom nem található.

Szervtenyészetekből kapott eredményeink azt mutatják, hogy a bél simaizmának alapvető szerepe van az ENS kialakításában. Az FK506 egy immunszuppresszív gyógyszer, amelyről kimutatták, hogy gátolja a simaizom differenciálódását (Fukuda és mtsai., 1998; Shyer és mtsai., 2013). Az AG1295 egy vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptor antagonist, amely egér embryoban gátolja a vizcerális simaizom differenciálódását (Kurahashi és mtsai., 2008). Megállapítottuk, hogy a simaizom fejlődését a két reagens kombinációja gátolja a leghatékonyabban. Fontos szempont, hogy ezeknek az inhibitoroknak nincs közvetlen hatása az ENCC-kre (Huycke és mtsai., 2019; Shyer és mtsai., 2013). Kimutattuk, hogy a simaizomfejlődés gátlása a bélidegrendszer mintázatának súlyos zavarához, a plexusok kialakulásának meghibásodásához vezetett a középbelben. Az inhibitorok megakadályozták az SMA expresszióját a középbelben, jelezve, hogy az alpha-simaizom aktint expresszáló kora simaizomszövet differenciálódása a középbel 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-simaizom aktin 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 fejlődési mintázatát.

A fejlődő csirke gyomorban (Faure és mtsai., 2015) és az emberi bélben (Fu és mtsai., 2004; Wallace és Burns, 2005) végzett tanulmányok alapján azt feltételezik, hogy a fejlődő bélcső teljes hosszában az ENCC kolonizációja a simaizom differenciálódása után alakul ki. Az ENCC-k hiánya a csirke gyomrában megakadályozza a simaizom megfelelő mintázatát (Faure és mtsai., 2015), jelezve, a dúclécből származó sejtek fontos szerepét a gyomor simaizom fejlődésben. Ezzel szemben azt találtuk, hogy az utóbélben, a simaizom normálisan

fejlődik ki ENCC hiányában, ez pedig alapvető különbségre utal a gyomor-bélrendszer ezen régióinak fejlődésében. Eredményeink összhangban állnak a korábbi *ex vivo* vizsgálatokkal, amelyek azt mutatták, hogy az izomrétegek normálisan kialakulnak a tenyésztett aneurális utóbélben (Newgreen és mtsai., 1980; Smith és mtsai., 1977).

**Összefoglalás: A kör alakú izomréteg biztosítja, hogy az enterális plexusok koncentrikus gyűrűkben a bél külső rétegében a körkörös simaizomréteg belső és külső felszínén helyezkedjenek el.** A háttérben zajló részletes molekuláris mechanizmusok ismeretlenek, azonban támaszkodhatnak a simaizomsejtek és az asszociált ECM fehérjék jeleire, amelyek meghatározzák az ENCC-k helyét.

#### **5.6. Hám-mesenchymális kölcsönhatások határozzák meg a bélidegrendszer radiális szimmetriát mutató fejlődését.**

Embryonális gyomorból származó szövetek *in vitro* rekombinációja azt mutatta, hogy a gyomorphám eltávolítása miatt, a mesenchymában megnövekedett az enterális neuronok száma és ectopicus helyeken is előfordultak ENCC-k (Sukegawa és mtsai., 2000). Ez a fenotípus felvetette azt az elképzelést, hogy az intesztinális epithelium gátolja az ENCC-k proliferációját és vándorlását. Ezen elképzelést utóbél epithelium-mesenchymális rekombinációkkal teszteltük úgy, hogy E5 embryoból izolált utóbél hámot helyettesítettük egy nem intesztinális típusú epitheliummal. A rekombinációhoz a bursa Fabricii-ből (a cloacához asszociált primer lymphoid szerv) származó hámot választottuk. Az intraembryonálisan tenyésztett szöveti rekombinációkban az ENCC-k az epitheliumhoz közel vándoroltak, ectopicus és rendellenesen nagyméretű ganglionok képződtek a hám alatt. Az eredmények kiemelik a bél hámjának fontosságát, és azt sugallják, hogy a hámszövet tartalmazhat egy gátló faktort, amely egyidejűleg chemorepulzív a befelé migráló ENCC-kre és anti-mitogén hatással is rendelkezik.

Korábban kimutattuk, hogy míg a bél hámszövege termel Sonic hedgehog (SHH) növekedési faktort, a bursa Fabricii hámja nem szekretálja ezt a morfogént (Nagy és Olah, 2010). Sukegawa és mtsai (2000) nemcsak azt vizsgálták, hogy a gyomorphám eltávolítása hyperganglionózishoz vezet, hanem azt is, hogy a SHH jelátvitel cyclopaminnal történő gátlása ugyancsak megnövekedett neuronális számot és ectopicus ganglionokat eredményez. Ezen adatok figyelembe véve feltételeztük, hogy az SHH-t termelő intesztinális epithelium is felelős lehet a bélidegrendszer mintázatáért. *Shh* null-mutáns egerekben a bél megnövekedett számú

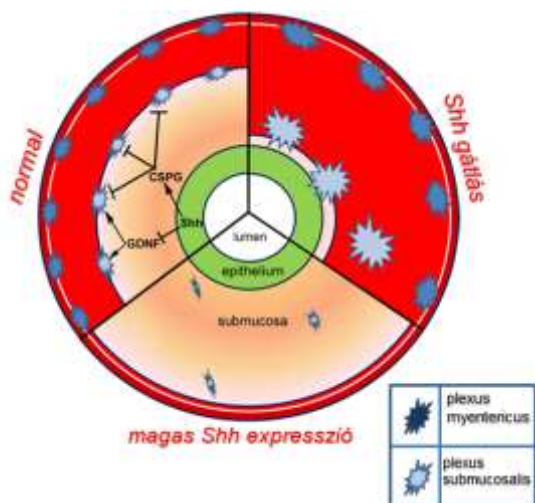
neuront tartalmaz, amelyek ectopicusan differenciálódnak az epithelium alatt és rendellenes eloszlást mutatnak a lamina propriában (Ramalho-Santos és mtsai., 2000; Jin és mtsai., 2015). A *Gas1* (a Hh sejtfelszíni receptor), *Ganz1*, illetve a *Gas1* intracelluláris effektor molekulákat kódoló gének deléciója hasonló fenotípusokhoz vezetett, rendellenes helyzetű enterális ganglionok és megnövekedett neuronszám kialakulását okozva (Biau és mtsai., 2013; Jin és mtsai., 2015). Ezzel szemben a *Gli1* túlzott expressziója a bélben található ganglionok szegmentális hiányát eredményezte (Yang és mtsai., 1997). Amikor SHH-t adtak az egémbryokból izolált bélhez, akkor az enterális ganglionok képződése leállt, az idegsejtek ritkán, szétszórva voltak találhatóak a bél falában (Fu és mtsai., 2004). Ezek az adatok alátámasztják a SHH gátló szerepét az ENCC-k proliferációjára, a sejtek migrációjára, a ganglionok kialakulására és az axon kiterjesztésére. SHH hozzáadása *in vitro* enterális idegi sejtaggregátumokhoz fokozta az sejtek proliferációját (Fu és mtsai., 2004), illetve cyclopamine kezelés a zebrahal embryok esetében gátolta az ENCC proliferációt és bél aganglionózist eredményezett (Reichenbach 2008). Egér, csirke és zebrahal embryokon végzett kísérletekből kapott ellentmondások arra utalnak, hogy a Hedgehog-aktivitás komplex szerepet játszik a bélidegrendszer fejlődése során.

Madár embryomanipulációs kísérletekkel (szervtenyésztés, szövetrekombináció, csirke-fürj kiméra, chorioallantois membrán átültetés és a retrovirális közvetítésű *in ovo* funkciónyerés) tanulmányoztuk az SHH szerepét a bélidegrendszer fejlődésében. Megállapítottuk, hogy a Hedgehog jelátvitel gátlása cyclopamine-nal vagy funkcióblokkoló ellenanyaggal hyperganglionózishoz vezet, míg a SHH túlzott kifejeződése aganglionózist okoz. Az ENCC-k sikertelen kolonizációja a sejtek migrációjának, osztódásának 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 expressziója megerősíti ezeket az eredményeket; miszerint az embryoban distalis aganglionózis, valamint súlyos hypoganglionózis látható a proximális vastagbélben (74. ábra).

Eredményeink megerősítik a korábbi megfigyeléseket és feltárják a SHH-jelátvitel alapvető szerepét az ENCC proliferációjának, differenciálódásának, migrációjának és mintázatának szabályozásában (Fu és mtsai., 2004; Biau és mtsai., 2013).

A SHH hatása feltehetően az ENCC-k által expresszált receptoron keresztül valósul meg, de nem volt bizonyított, hogy az ENCC-k kifejezik-e a SHH-receptorokat. Fu és mtsai (2004) és Ngan és mtsai (2011) egyaránt beszámoltak az ENCC-k *PTC1* expressziójáról, illetve hogy a *Ptch1* ENCC-specifikus delécióna csökkenti az sejtek proliferációját. Zebrahal embryóban is feltételezték, hogy a PHOX2b+ ENCC-k *PTC1*-et expresszálnak (Reichenbach és mtsai., 2008). Ezzel szemben a *Ptc1*, *Gli1* vagy *Gli2* által vezérelt beta-galaktozidázt expresszáló riporter egerek nem mutatnak *LacZ* expressziót az ENCC-kben (Washington-Smoak és mtsai., 2005; Kolterud és mtsai., 2009), ami arra utal, hogy az SHH útvonal génjei nem fejeződnek ki az egér ENCC-kben. Amikor összehasonlítottuk a *PTC1* és a *PTC2 in situ* hibridizációját embryonális madár bélben és a tenyésztett ENCC-kben, mindkét receptort megtaláltuk a bél mesenchymális kompartmentumban, de nem a p75+ ENCC-kben. A SHH receptor expressziójának hiánya két lehetőséget kínál a SHH-közvetített hatások magyarázatára a bélidegrendszer fejlődésében: (1) SHH egy PTC-független útvonalon közvetlenül hat az ENCC-kre, vagy (2) a SHH hatása az ENS-re közvetett módon az ENCC környezetére hat. Annak eldöntésére, hogy a SHH közvetlenül befolyásolhatja-e az ENCC-ket, a bélszakaszokat GDNF-el kezeltük, amely elősegíti az ENCC-k masszív migrációját a bélből egy fibronectinnel bevont felületre. 24 órával később, miután a sejtek kivándoroltak a fibronectin felszínre, SHH fehérjét adtunk a tenyészetbe, azonban ez nem befolyásolta az ENCC migrációját. Ezzel szemben, amikor SHH-t és GDNF-et egyszerre adtuk a béltenyészetbe az ENCC-k migrációja nem történt meg, összhangban az embryonális egérbélben leírt eredményekkel (Fu és mtsai., 2004). Ez azt jelzi, hogy a SHH nem gátolja közvetlenül az ENCC vándorlását, hanem közvetett hatást gyakorol, feltehetően úgy, hogy megváltoztatja a bél mikrokörnyezetét és így megakadályozza, hogy az ENCC-k képesek legyenek reagálni az exogén GDNF-re.





**74. ábra: SHH hatása a bélidegrendszer fejlődésében.** Magas SHH koncentráció hatására ectopicus ganglionok fejlődnek a bélfal mesenchymájában és hypoganglionosis alakul ki. SHH gátlása során ellentétes fenotípus jellemzi a bélidegrendszer: nagyméretű ganglionok alakulnak ki az epithelum közelében.

Megvizsgáltuk a SHH hozzáadásának és gátlásának hatását *ex vivo* és *in ovo*, valamint megfigyeltük, hogy a SHH aktivitás modulálása drámai változásokhoz vezet az ECM fehérjék expressziójában, amelyek a ganglionléc eredetű sejtek migrációjának ismert szabályozói (Payette és mtsai., 1988; Newgreen és Hartley, 1995; Nagy és mtsai., 2009). Míg a laminin, a fibronectin és a kollagén I támogatja a dúcléc eredetű sejtek vándorlását (permisszív hatás), addig a kondroitin-szulfát proteoglikán típusú molekulák, beleértve a versican és a kollagén IX-et gátolják a migrációt (Bronner-Fraser, 1986; Dutt és mtsai., 2006a; Newgreen és Thiery, 1980; Oakley és mtsai., 1994; Perris és mtsai., 1996; Szabó és Mayor, 2018). Megállapítottuk, hogy SHH erősen indukálja a versican, a kollagén IX és a CS-56 expresszióját a bélben, míg a cyclopamine csökkenti e fehérjék kifejeződését. Ezen kívül mind az SHH+ bélhám, mind a SHH-t tartalmazó mikrogöngy képes indukálni a kollagén IX ectopicus expresszióját bursa Fabricii mesenchymájában, amely normális körülmények között nem fejezi ki ezeket a mátrix molekulákat. Az SHH indukált versican expresszió indukcióját fejlődő trigeminális ganglionokban is bizonyították (Fedtsova és mtsai., 2003).

**Összefoglalás: eredményeink igazolják, hogy a bél epitheliumból származó SHH növekedési faktor koncentrációgradiense a lamina propriában olyan kondroitin szulfátban gazdag gátló ECM környezetet hoz létre, amely megakadályozza, hogy az ENCC-k az epithelium közelébe vándoroljanak, ellentétben a szintén epitheliumból származó netrin molekula chemoattraktív hatásával (Jiang és mtsai., 2003), ezáltal kijelöli a plexus submucosus leendő helyét.**

**5.7. Az ENCC-k extracelluláris mátrixot (tenascin-C, agrin és kollagén XVIII) termelnek, hogy átalakítsák mikrokörnyezetüket és szabályozzák migrációjukat az ENS fejlődése során.**

Az ENS fejlődése során a coecum területe olyan speciális régiót képvisel, ahol a vastagbélidegrendszer létrehozó ENCC-k kiválnak a migráló sejtkötegekből és izolált sejtekként jutnak előre az utóbélben (Druckenberg és Epstein, 2005). A coecalis régió ezen felül az a terület, ahol a GDNF és EDN3 faktorok a legerősebb expressziót mutatják (Barlow és mtsai., 2003; Leibl és mtsai., 1999; Nagy és Goldstein, 2006a), és ahol olyan specifikus faktorok, mint a  $\beta 1$  integrin (Breau és mtsai. 2009) kifejtik hatásukat. Ennek a régiónak a sajátos jellemzői összhangban állnak a coecum lehetséges szerepével az ENCC-k felkészítésében az utóbél kolonizációjára. Annak vizsgálata során, hogy a fejlődő bélben vannak-e olyan coecum-specifikus tényezők, amelyek meghatározzák az utóbél kolonizációját, megvizsgáltuk különböző ECM fehérjék expresszióját. Immunocitokémiai eredmények alapján megállapítottuk, hogy a legelől haladó ENCC-k érkezése előtt a coecum mesenchymális telepe nem mutat tenascin expressziót. Ahogy a vándorló ENCC-k belépnek a coecum területére, tenascin akkumuláció figyelhető meg az érkező sejtek körül. Ez a dinamikus expressziós mintázat arra utalhat, hogy a migráló ENCC-k befolyásolják az extracelluláris környezetet a distalis bél kolonizációja folyamán. Aganglionikus utóbeleik chorioallantois membránon történő tenyésztésével megállapítottuk, hogy a tenascin expresszió hiányzik, különösen a submucosalis régióban, ami arra utal, hogy az ENCC-k tenascint termelnek, vagy indukálják annak mesenchymális expresszióját. Korai embrióból izolált velőcső tenyészetekkel és testüreg kimérák alkalmazásával azt találtuk, hogy amikor madár-ENCC-k kolonizálják az aneurális patkány-graftot, akkor csirke eredetű tenascint fejtenek ki, ami kísérletesen bizonyítja, hogy az ENCC-k termelik a tenascint.

Azon csirke embryon végzett korábbi tanulmányok, amelyek azt vizsgálták, hogy a ganglionléc sejtek termelnek-e tenascint, ellentmondásos eredményeket hoztak. Tan és mtsai (1987, 1991) szerint a korai ganglionléc vándorlási mintázatának kialakulása során a tenascint kizárólag a szomiták expresszálják, ami független a ganglionléc sejtek jelenlététől. Ezzel szemben Stern és mtsai (1989) azt találták, hogy a velőcsőből kilépő ganglionléc sejtek akkor expresszálják a tenascint, amikor a szomitákon keresztül vándorolnak. Az utóbbi következtetést más kutatócsoportok is megerősítették (Tongiorgi és mtsai., 1995; Tucker,

1993; Tucker, 2001). Eredményeink az utóbbi vizsgálatokkal állnak összhangban. A madárembryóban megfigyelt tenascin expressziós mintázat eltér a patkányokban (Newgreen és Hartley, 1995) és az egérben (Breau és mtsai., 2009) leírtaktól, ahol a tenascin diffúz módon expresszálódik a külső mesenchymában, az ENCC-k körül nem mutat egyértelműen fokozott expressziót. Csirke embryóban a plexus submucosus szintjén találjuk a legerősebb kolokalizációt a tenascin és az ENCC-ket jelölő markerek között. Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a tenascin elősegíti a dúlcéscetek migrációját és invazivitását (Halfter és mtsai., 1989; Tan és mtsai., 1987; Tucker, 1993, 2001). Kísérleteink során, *in vitro* migrációs vizsgálattal azt találtuk, hogy a tenascin elősegíti az ENCC-k migrációját mind a műanyag, mind a fibronectinnel bevont felületeken. Ezek az eredmények összhangban vannak a tenascin ismert anti-adhéziós szerepével (Fischer és mtsai., 1997; Tucker, 2001) és azon képességével, hogy gátolja a sejtek integrin által közvetített, fibronectinen (bél mesenchymában erős expressziót mutató ECM fehérje) való letapadását (Chiquet-Ehrismann és mtsai., 1988; Lotz és mtsai., 1989; Probstmeier és Pesheva, 1999). Ez az anti-adhéziós hatás lehetővé teszi a sejtek gyorsabb leválását az ECM szubsztrátumról, és ezáltal megkönnyíti a ganglionléc sejtek *in vivo* migrációját is (Halfter és mtsai., 1989). Breau és mtsai (2009) velünk ellenétesen arra a következtetésre jutottak, hogy a tenascin gátolja az ENCC-k migrációját. Ez az eltérés fajbeli különbségek (csirke versus egér), vagy egyéb technikai tényezők következménye lehet: egyrészt jóval magasabb tenascin koncentrációt használtak (20 mg/ml), az általunk alkalmazottnál (1 mg/ml), ahol a 20x töményebb koncentráció gátolhatja a sejtek vándorlását (Melkonian és mtsai., 2004); másrészt a tenascin migrációra kifejtett hatásait vitronectin-nel bevont felületen vizsgálták, míg csoportunk műanyagot és fibronectint használt; végül laboratóriumunkban célzottan embryonális coecum tenyészetben vizsgáltuk az ENCC-k migrációját, míg a másik kutatócsoport 12,5 napos egér embryonális középbelet alkalmazott kísérleteihez.

A tenascin ENCC-k általi expressziója tovább hangsúlyozza az ENCC-k és mikrokörnyezetük szoros kapcsolatát az ENS fejlődése során. Míg a colorectalis aganglionózisról általában úgy vélekednek, hogy azt vagy az enterális őssejtekben, vagy a bélfal mikrokörnyezetében bekövetkező hiba okozza, eredményeink azt mutatják, hogy az ENCC-k modulálhatják mikrokörnyezetüket, ezért az ENS fejlődésének ezen két alapvető szabályozó elemét nem mindig lehet teljesen szétválasztani. Ahhoz, hogy megértsük az

ENCC-k bél mesenchymára gyakorolt hatását, ganglionmentes utóbeleket állítottunk elő *in vivo* vagus régió ejtett velőcső ablációjával és *ex vivo* CAM graftok alkalmazásával. Mindkét embryomanipulációs modell esetében, az aganglionikus utóbél ECM mintázatában határozott különbség mutatkozott a kontroll állatokéhoz képest: csökkent tenascin expresszió jellemezte a submucosalis régiót. Ez arra utal, hogy míg a külső bélfal képes saját tenascint előállítani, ami valószínűleg a simaizomsejtekből származik (Grumet és mtsai., 1985), addig a belső mesenchyma tenascin 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. A ganglionmentes vastagbélben a tenascin expresszió megszűnése hozzájárulhat a mesenchyma csökkent permisszivitásához a később érkező (Druckenbrod és Epstein, 2009; Meijers és mtsai., 1987) vagy a transzplantált ENCC-k (Rothman és mtsai., 1993) számára. Ez a megfigyelés azt is hangsúlyozza, hogy az aganglionózis, az emberi Hirschsprung-betegséghez hasonlóan, további káros hatásokkal járhat a bél szerkezetére és működésére az enterális ganglionok hiányán felül. Az aganglionózis okozta mikrokörnyezeti változások megértése kritikus fontosságú a Hirschsprung-kór és más neurointesztinális betegségek hatékony őssejt-alapú terápiájának kidolgozásához (Hotta és mtsai., 2013; Metzger és mtsai., 2009). Különösen érdekes megállapítás a vagus és a sacralis régióból származó ENCC-k közötti különbség a tenascin expressziójának szintjén. **Megállapítottuk, hogy a vagus ganglionlécből származó sejtek expresszálják a tenascint.** Az egyetlen korábban azonosított molekuláris különbség a vagus és a sacralis eredetű ENCC-k között az volt, hogy a vagus régióból származó ENCC-k erősebb *RET* expressziót mutatnak a sacralis ganglionléc sejtekhez képest (Delalande és mtsai., 2008). Feltehetően a tenascin expresszió hiánya felelős a sacralis eredetű ENCC-k csökkent invazivitása miatt. További különbségek azonosítása a vagus és a sacralis dúclécből származó ENCC-k között hozzájárulhat az ENS fejlődésének és a Hirschsprung-kór etiológiájának jobb megértéséhez.

Korábbi *in vitro* és *in vivo* kísérletek alapján megállapították, hogy a mesenchymát érintő elváltozások befolyásolják a sejtek migrációját és a fejlődő bél mikrokörnyezetét érintő elváltozások az enterális plexusok veleszületett rendellenességeit okozhatja (Kapur és mtsai., 1995; Nagy és mtsai., 2016; Vaos, 1989). Extracelluláris mátrixot célzó kísérleti munkánk második részében részletesebben karakterizáltuk a vándorló ENCC-k és az extracelluláris

mikrokörnyezet közötti kölcsönhatást. Kiemelten olyan ECM molekulák expressziós változását vizsgáltuk, melyek a ganglionléc-eredetű sejtek vándorlásának ismert szabályozói (Payette és mtsai., 1988, Newgreen és Hartley 1995, Nagy és mtsai., 2009). A laminin (Nagy és mtsai., 2009, Fu és mtsai., 2020), a fibronectin (Akbareian és mtsai., 2013), a kollagén I (Young és Newgreen 2001, Nagy és Goldstein 2006a, Chevalier és mtsai., 2016) és a tenascin (Akbareian és mtsai., 2013) serkenti, a kollagén VI (Soret és mtsai., 2015), valamint a CSPG-ok családjába tartozó versican és a kollagén IX gátolja a ganglionléc sejtek migrációját (Newgreen és Thiery 1980, Bronner-Fraser 1986, Oakley és mtsai., 1994, Perris és mtsai., 1996, Dutt és mtsai., 2006; Nagy és mtsai., 2016).

A különböző fejlődési stádiumok ECM mintázatának immunhisztokémia összehasonlítása során több olyan heparán-szulfát proteoglikán fehérjét (HSPG) találtunk, amely intenzíven expresszálódik a fejlődő bélidegrendszerben. Kimutattuk, hogy a korai embryóban a vándorló ENCC-k közvetlen környezetében intenzíven expresszálódik a kollagén XVIII, agrin és perlecan. A kollagén XVIII volt az első olyan molekula a kollagének közül, amelyről kimutatták, hogy heparán-szulfát oldalláncokkal rendelkezik (Halfter és mtsai., 1998). Ez a HSPG fehérje széles körben expresszálódik az epitheliális és endotheliális basalis membránokban és közrejátsszik a neuronok és ganglionléc sejtek fejlődésben. A kisagyban a Purkinje-sejtek kollagén XVIII-at és az N-terminális végéről enzimatikusan lehasított "matricryptin"-jét, az endostatint termelik, amelyek szükségesek az agyi szinapszisok és az axonterminálisok szerveződéséhez (Su és mtsai., 2012). *Caenorhabditis elegans* és *Drosophila melanogaster* embryokon végzett kísérletek során kiderült, hogy a kollagén XVIII és az endostatin fehérjék esszenciális szerepet játszanak a neuron migrációban és az axonnövekedésben (Ackley és mtsai., 2001; Meyer és Moussian, 2009). Kollagén XVIII morpholino-mediált csendesítése zebrahalban a ganglionléc eredetű sejtek migrációs zavarához vezetett (Banerjee és mtsai., 2013). Korai egér embryokból izolált ENCC-k RNS szekvenálása során kiderült, hogy a kollagén XVIII egyike a progenitor specifikus géneknek, amely egybecseng azzal az észrevételünkkel, miszerint ez a fehérje a differenciálatlan, intenzív migrációt mutató ENCC-k szintjén expresszálódik (Lasrado és mtsai., 2017). A kollagén XVIII széles expressziós mintázata és sokrétű szerepe ellenére, a null-mutáns egerek csak enyhe fenotípusos különbségekkel rendelkeznek, úgymint a retina leválás és degeneráció, maculáris abnormalitások és velőcső záródásában észlelt zavarok (Heljasvaara és mtsai., 2017).

Ez az ECM fehérjék körében előforduló funkcionális redundanciának lehet egy következménye, amely gyakran megfigyelhető HSPG-k esetében. Azt találtuk, hogy a kollagén XVIII az ENCC migráció számára permisszív közeg kialakításában vesz részt, de a kollagén XVIII molekula hiánya, ahogy a null-mutáns egér esetében is láttuk, nem jár feltétlenül sejt-vándorlási defektussal.

A másik periganglionárisan megjelenő HSPG az agrin, mely a basalis membránok mellett jelen van a fejlődő agy területén, illetve kimutatható a csirke érző ganglionjaiban is (Banerjee és mtsai., 2013; Halfter és mtsai., 1997; McCarthy, 2015; Su és mtsai., 2012). Halfter és munkatársai leírták az éretlen Schwann-sejtek által termelt agrin gátló hatását: *in vitro* tenyészetekben az agrin fehérje akadályozta a retinális neuritnövekedést (Halfter és mtsai., 1997). Az agrin fejlődő béliidegrendszerben történő expressziója csak a fejlődés későbbi stádiumában jelenik meg, először az embryonális fejlődés 10. napján, 2 nappal az ENCC-k kolonizációját követően. Annak érdekében, hogy ezen jellegzetes expressziós mintázatnak a jelentőségét megismerjük, megvizsgáltuk a kollagén XVIII és az agrin ENCC migrációra kifejtett hatását. Azt találtuk, hogy az agrin erősen gátolja az ENCC migrációt, feltehetően a receptorával, a disztroglikánnal történő interakciója által, amelyet az enterális ganglionok expresszálnak. Ezzel ellentétben a kollagén XVIII egy permisszív környezet kialakításában vesz részt a migráció létrejöttéhez, de nem elengedhetetlen komponens. Úgy gondoljuk, hogy az agrin meggátolja az ENCC-k migrációját, ahogy elérik célhelyüket és elköteleződnek a neuronális vagy gliális differenciáció irányába. Előző eredményeink tükrében, amelyek szerint az ENCC-k tenascin expresszálnak a legelő haladó sejtek szintjén, még érdekesebbé válik a jelenlegi megfigyelés. A tenascin expresszáló ENCC-k specifikusan vagus régióból származó ganglionléc eredetű sejtek, amelyek migrációját maga a tenascin aktívan segíti elő (Akbareian és mtsai., 2013). Összességében ezen eredmények felhívják a figyelmet az ENCC-k azon jellemző tulajdonságára, amely az ECM proteinek autonóm termelésében nyilvánul meg.

Az agrin egy nagy méretű HSPG molekula, melynek erőteljes expressziója figyelhető meg a fejlődő agyban és tulajdonképpen minden fejlődő szerv membrana basalisában. Emellett agrint expresszálnak az éretlen Schwann-sejtek, illetve a fejlődő csirke embryo érző ganglionjai is (Halfter és mtsai., 1997; Lasrado és mtsai., 2017). Összhangban jelenlegi eredményeinkkel, *in vitro* kísérletekben korábban kimutatták az agrin gátló hatását a neuronok növekedésre. Érdekes módon az alpha-5-beta-1 expresszáló sejtek kötődése agrin felszínhez meggátolható



a beta-1 integrinhez kötődő ellenanyaggal, amelyről ismert, hogy fontos szerepet játszik a bélidegrendszer fejlődésében (Breau és mtsai., 2006; Breau és mtsai., 2009b; Martin és Sanes, 1997; Nagy és mtsai., 2009). A kollagén XVIII-at és az agrint is aktívan termelik az ENCC-k, akárcsak a tenascint. Ezek az eredmények kiemelik az ENCC-knek azt a különleges szerepét, hogy képesek módosítani az extracelluláris környezetük összetételét. Génexpressziós vizsgálatok nemrég kimutattak számos olyan ECM-hez kötött gént, amelyeket a *Drosophila* embryok vándorló hemocitái és izomsejt prekursorai expresszálnak. Ezen gének specifikus expressziója megfigyelhető ugyanakkor a csirke dúcléc eredetű sejtekben is (Bae és mtsai., 2017). Hasonlóan a ganglionléc-eredetű sejtekhez, a foetális egér izom őssejtek migrációs képessége kapcsolatban áll a sejtek kollagén VI és tenascin termelésével (Tierney és mtsai., 2016). Ezekről a fehérjékről jól ismert, hogy szabályozzák a sejt migrációs folyamatokat felszíni receptorok által vagy az ECM merevségének („stiffness”) feloldásával.

A kollagén XVIII és az agrin *in vivo* szerepei a bélidegrendszer fejlődése során sokrétűek lehetnek; a sejt migrációra kifejtett hatás mellett szabályozhatják a neuronális és gliális differenciációt, a ganglion jellegű sejtaggregációk létrejöttét *in vitro*, illetve a neuronok nyúlványainak képződését. Ezen fehérjék posztnatális bélben is megfigyelhető egyenletes expressziója arra utal, hogy fontos szerepet töltenek be a kifejlett bélidegrendszer normál szerkezetének és működésének fenntartásában. 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 azokat a különböző immunmediátor molekuláktól is. Ez a megállapítás összhangban van az agrinnak az agyban betöltött szerepével, ahol akkumulációja a kapillárisokat övező basalis membránokban elősegíti a mikrovaskuláris átjárhatatlanságot és ezáltal a vér-agy gát kialakulásához járul hozzá (Barber és Lieth, 1997). A kollagén XVIII és agrin által kiváltott mikrokörnyezeti változások *in vivo* vizsgálatának fontossága a bélidegrendszer fejlődése során, illetve ezek fiziológiai szerepe az érett bélidegrendszert célzó jövőbeni kutatásokban kiemelt fontosságú lehet.

Az ENCC-k azon szerepének megismerése, hogy aktívan képesek mátrix környezetük megváltoztatására fontos terápiás és klinikai lehetőségeket tár fel. A Hirschsprung-betegség esetében például, a ganglionmentes bélszakaszban nemcsak az ENCC-k hiánya komoly probléma, hanem az ECM hálózat kialakulása is zavart szenved. Az *Ednrb* mutáns egerek

distalis vastagbélének periganglionikus régiójában hiányzik a kollagén XVIII és az agrin. A Hirschsprung-betegség okait és hatásait a bél fejlődése során tehát sokkal szélesebb körben kell vizsgálni. A regeneratív terápiában, ahol a Hirschsprung-betegség következtében megjelenő ganglionmentes 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 mikrokörnyezet hatására. Az agrin expresszió és ezáltal a migratorikus gátló hatás csökkentése, illetve a promigratorikus faktorok hatásának előtérbe helyezése, mint a kollagén XVIII és a tenascin, olyan új lehetőségeket kínálnak, amelyek a neurális őssejtek migrációját segíthetik elő a transzplantációt követően. Ehhez kapcsolódóan további kísérletek szükségesek az ECM funkcionális, normál és patológiás bélidegrendszer fejlődésre kifejtett szerepének meghatározására. Figyelembe véve a fehérjék hatalmas számát, amely részt vesz a bélben található komplex ECM kialakításában, egy részletes transzkriptomikai vagy proteomikai vizsgálat nagyban hozzájárulna a normál bélidegrendszer fejlődés jobb megértéséhez, kiegészítené a jelenlegi tudásunkat a bélrendszert érintő neurális betegségek patofiziológiájáról, illetve új lehetőséget kínálna az őssejtterápia sikeres alkalmazásához.

### 5.8. Címlapfotók:

Az elmúlt néhány évben publikált embryonális bélidegrendszer 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).



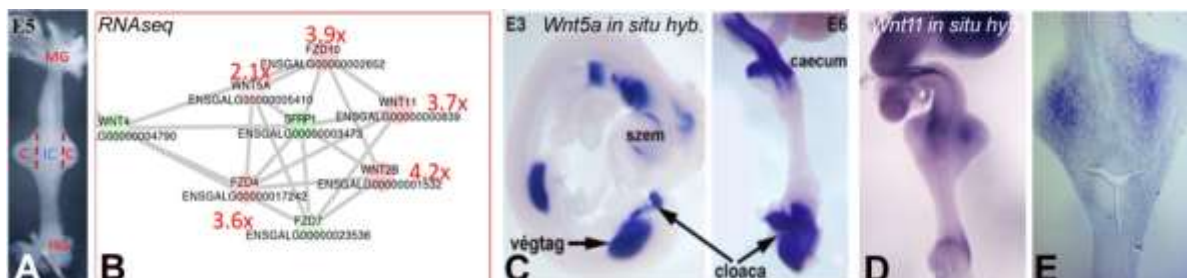
75. ábra: Címlapfotók.

## 5.9. További kutatások, tervek:

Az elmúlt évtizedben számos embryomanipulációs módszert sikerült a budapesti laboratóriumban meghonosítani: embryonális kiméra kísérletek, őssejtek carbocyanin alapú sorstérképezés, *in vitro* szövetrekombináció, embryonális szervtenyésztés, „stripe-choice” migrációs teszt, microgyöngy beültetés, chorioallantois transzplantáció, velőcső ablatió, embryonális kiméra készítés, ganglionléc sejtek izolálása, *in situ* hibridizáció és RNAseq transzkriptom analízis. Ezekkel a módszerekkel felvértezve, szerteágazó külföldi kollaborációkat kiépítve jelenleg a következő kérdéseket tanulmányozzuk:

### 1.) Az embryonális coecumból származó WNT11 faktor hatása az ENS fejlődésére.

Az embryonális coecumnak vastagbél idegrendszer fejlődésében betöltött szerepét klasszikus embryomanipulációs technikák, szervtenyésztés és molekuláris biológiai módszerek (*in situ* hibridizáció, RNAseq analízis) ötvözésével vizsgáljuk. Eddigi kísérleteinkkel igazoltuk, hogy: 1) a coecumon áthaladó ganglionléc sejtek intenzívebben osztódnak, mint a bél más szakaszaiban. 2) a coecum korai eltávolítása miatt, a ganglionléc eredetű sejtek proliferációja csökkent, korai neurális differenciálódás, az utóbelet distalis aganglionozis jellemzi (Hirschprung-kórra jellemző fenotípus). 3) az RNAseq analízis (76. ábra A, B) és *in situ* hibridizációs eredmények (76. ábra C-E), valamint a rekombináns WNT5a és WNT11 fehérjékkel embryonális szervtenyészeteken tett megfigyelések szerint, a coecumban kifejeződő WNT fehérjék fontos szerepe játszanak az utóbél ENS fejlődésében. A kísérleteket külföldi kollaborációban végezzük Dr. Alan Goldstein (Harvard Medicaly School, Boston, USA) laboratóriumával. Nagy N, et al. *Essential role of the avian ceca for formation of the hindgut enteric nervous system* (kézirát megírás alatt)



76. ábra: Coecum RNAseq analízise és validálása.

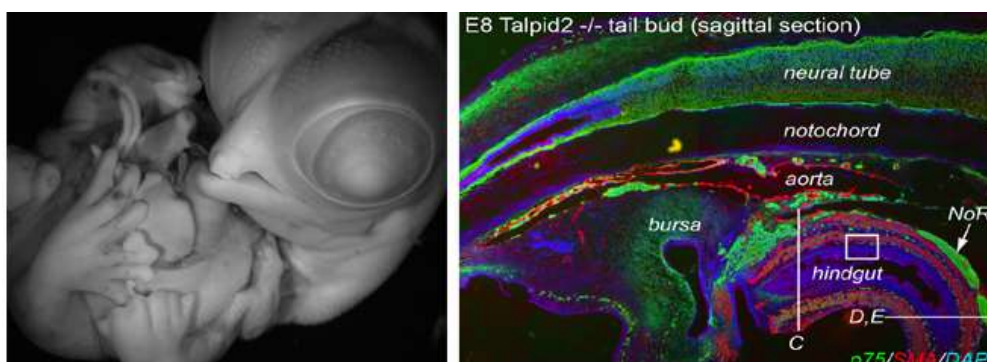
**2.) Bélidegrendszer-extracelluláris mikrokörnyezet kölcsönhatása *Talpid<sup>3</sup>* mutáns vastagbélben.** A *Talpid<sup>3</sup>* és *Talpid<sup>2</sup>* gének a primér csillók képzéséért felelős fehérjét kódolnak, amelyek hiányában a Sonic hedgehog (SHH) növekedési faktor jelátvitelének zavarára hasonló anomáliák figyelhetők meg. A *Talpid<sup>3</sup>* mutáns csirke (77. ábra A, B), illetve egér embryora (77. ábra D-F) csökevényes vastagbél és koponya deformitás jellemző. A kísérleteket külföldi kollaborációban végezzük Dr. Alan Burns és Dr. Jean-Marie Delalande (University College of London, Inst. of Child Health, London) laboratóriumával.



**77. ábra: *Talpid* gének mutációja csirke (A, B) és egér (D-F) modellrendszerben.**

(társ-elsőszerző) Jean Marie Delalande<sup>1-4</sup>, Nandor Nagy<sup>2-3</sup>, Conor J. McCann<sup>4</sup>, Dipa Natarajan<sup>4</sup>, Julie E. Cooper<sup>5</sup>, Gabriela Carreno<sup>5</sup>, Alison Campbell<sup>6</sup>, Nicole Laurent<sup>7</sup>, Sophie Thomas<sup>8</sup>, Caroline Alby<sup>9</sup>, Tania Attié-Bitach<sup>8-10</sup>, Stanislas Lyonnet<sup>9</sup>, Malcolm P. Logan<sup>11</sup>, Allan M. Goldstein<sup>2</sup>, Megan G. Davey<sup>12</sup>, Robert M.W. Hofstra<sup>13</sup>, Nikhil Thapar<sup>4-14</sup> & Alan J. Burns<sup>4-13-15</sup>. *Talpid<sup>3</sup>* regulates multiple aspects of neuromuscular patterning during gastrointestinal development in animal models and human. (*eLife*: pozitív bíráló; a kézirat bíráló alatt)

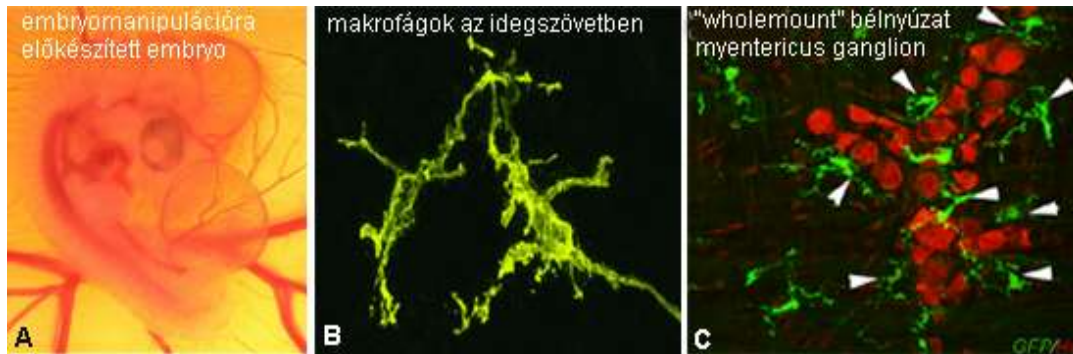
Egy másik kollaboráció Dr. Samantha A. Brugmann (Divisions of Plastic Surgery and Developmental Biology, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, USA) kutatócsoportjával a *Talpid2* mutáns embyonális minták protein és RNS szintű vizsgálatára, a craniofacialis elváltozásainak jellemzésére. és a fejlődő béltraktus radiális mintázatának komparatív embryológiai vizsgálatára fókuszálunk (78. ábra).



**78. ábra: *Talpid2* mutáns csirke embryo. A.) A végtagokon polydactylya alakul ki.**

**B.) A vastagbélben rendellenes idegrendszer figyelhető meg.**

**3.) Egy új sejtípus leírása, az intraganglionáris makrofágok karakterizálása transzgenikus csirke és egér állatmodellekben, ontogenezisének nyomonkövetése embryomanipulációs módszerekkel.** A központi idegrendszert neuroektodermális eredetű neuronok és gliasejtek, valamint a szikhólyagból származó mikroglia sejtek alkotják. A bélidegrendszerben jelenlegi ismereteink szerint csak ganglionléc eredetű neuronok és glia sejtek találhatóak. Legutóbbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a madár és emlős bélidegrendszer ganglionjaiban nyúlványos myeloid sejtek fordulnak elő (Dora et al, 2018). Ezek a megfigyelések felvetették annak a lehetőségét, hogy az enterális ganglionokban a ganglionléc eredetű neuronokon és gliasejteken kívül egy harmadik sejtpopuláció is létezik. Az "intraganglionáris makrofágok" (IGM) az enterális neuronokat és gliát körbefonva, a ganglionokat környezetüktől elhatároló kötőszövetes kapszulán (Nagy et al, 2018) belül helyezkednek el, és mikroglia/makrofág specifikus sejtfelszíni markereket expresszálnak (Dora et al, 2018). (79. ábra).



**79. ábra: A bélidegrendszerben az agyi mikrogliahoz hasonló sejtípus fejlődik. *CSF1R<sup>GFP</sup>* embriók (A,B) és *CX3CR1<sup>GFP</sup>* egerek embryomanipulációja lehetővé teszi az ENS-asszociált mikroglia-szerű sejtek embryonális és felnőtt jellemzését.**

Egér vastagbélen végzett immunfestéseink megerősítették, hogy a CX3CR1+ muscularis makrofágok egy alpopulációja az enterális ganglionokon belül található és hasonlóan a mikrogliahoz CD45, CD11b, Iba1, CSF1R markerek expresszióját mutatják. Az intraganglionáris makrofágok elektronmikroszkópos morfológiája azt mutatja, hogy a sejtek ganglionba kerülés után jelentős morfológiai transzformáción mennek keresztül: extenzív vakuolizációt, mitokondrium-felhalmozódást és aktív fagocitózis jeleit mutatják. Az IGM-et célzó vizsgálatokkal az enterális ganglionok körül található extracelluláris mátrix barrier szerkezetét és élettani funkcióját kívántuk megérteni. Ez a barrier a vér-agy gáthoz hasonlóan egy folyamatos enterális glia-talp rétegből, számos ECM fehérjéből, és egy bazális membránból áll.

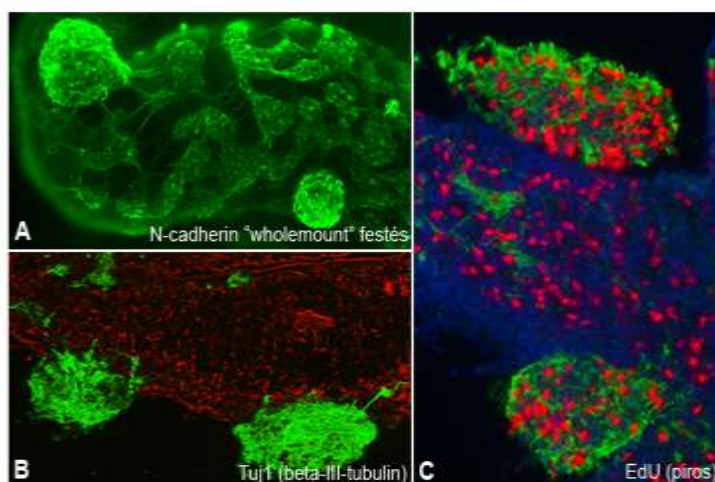


Az elektronmikroszkópiával és immunhisztokémiával kimutatott agrint és kollagén IV-et tartalmazó ganglion bazális membrán barrier funkciójának teszteléséhez kisméretű 4- és 10 kDA-os FITC dextránt, majd nagyméretű 66 kDA-os fluoreszcens albumint fecskendezünk egerek farokvénájába. A feltöltések információt nyújtanak a vér-bélidegrendszer barrier permeabilitásáról és azt össze tudtuk hasonlítani a vér-agy gát barrier-rel. A fluoreszcens dextrán részecskék fagocitózisa alkalmas volt a makrofágok migrációjának in vivo követésére is. A makrofágok aktivitása és a barrier közötti kapcsolatot DSS-indukált egér bélgyulladásos modellben tanulmányoztuk, amit ötvöztünk az L-chlodronate-al előidézett makrofág deplécióval is.

Összefoglalva: a bélidegrendszert határoló ECM barrier normál és patológiás körülmények között érzékenyen reagál a makrofágok jelenlétére, aminek kulcsszerepe lehet a bélidegrendszert érintő gyulladások patomechanizmusában. (*David Dora, Szilamer Ferenczi, Rhian Stavely, Viktoria E. Toth, Zoltan V. Varga, Tamas Kovacs, Ildiko Bodi, Ryo Hotta, Krisztina J. Kovacs, Allan M. Goldstein, Nandor Nagy (2020) Evidence of a Myenteric Plexus Barrier and its Macrophage-Dependent Degradation during Murine Colitis: Implications in Enteric neuroinflammation. közlésre elküldve Gastroenterology, 2020 szeptember 25)*

#### **4.) GDNF növekedési faktorról indukált idegi őssejtek izolálása.**

A bélidegrendszeri őssejtek izolálása GDNF-indukált sejtaggregációs módszerrel (80. ábra). A korábbi sejtizolációs technikánál (immunobead sejtszeparálás vagy sejt-sorter analízis) sokkal gyorsabb és hatékonyabb sejtizolációs technikát dolgoztunk ki. Ez a módszer kiváló lehetőséget nyújt a bél különböző szakaszát kolonizáló idegi őssejtek izolálására, fejlődési potenciáljának tanulmányozására is.



**80. ábra: GDNF hatására idegi sejtaggregátumok jönnek létre. A.)** E7 embrionális bélszakaszok 10 ng/ml GDNF jelenlétében történő tenyésztése során, a bélcső felszínén, kiemelten a coecum magasságában számos N-cadherin+ sejtaggregátum jelenik meg. **B.)** Korai neuron specifikus immuncitokémiai festéssel (Tuj1) és **C.)** EdU proliferációs analízissel igazoltuk, hogy a sejtaggregátumok (átmérő: 150-200  $\mu$ m) intenzíven osztódó ganglionléc eredetű őssejtekből állnak.



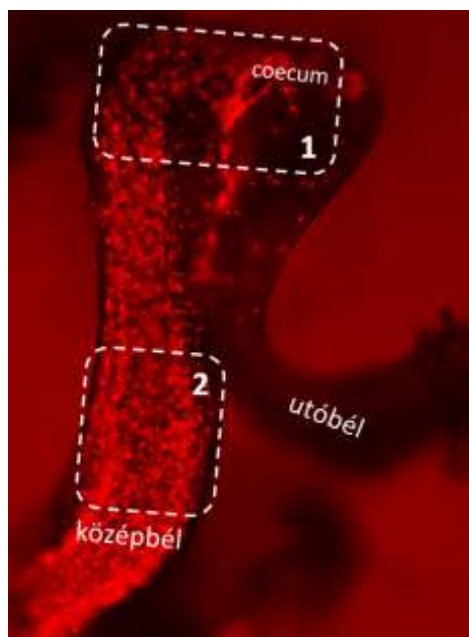
Wnt1-tdT transzgenikus egér és GFP-csirke embryonális függesztett béltenyészetben a mesenchymális eredetű GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor, növekedési faktor) hozzáadására 72 óra alatt a ganglionléc-eredetű sejtek kivándoroltak a tenyésztett bélszakasz felszínére, ahol neurosphere-szerű sejtaggregátumokat hoztak létre. Immuncitokémiai adatokkal igazoltuk, hogy GDNF-indukált idegi sejtaggregátumok (gangliosphere-nek neveztük el) kiemelten differenciálatlan SOX10+ ganglionléc eredetű sejteket tartalmaztak, amiben pár nap tenyésztés után neuron és glia irányú differenciálódás figyelhető meg. Velőcsőbe történő GFP vektorok elektroporációja, velőcső-transzplantáció, és chorioallantois membrán transzplantációval végzett kiméra kísérletekkel igazoltuk, hogy a GDNF-el indukált gangliospherek multipotens őssejteket tartalmaznak. Az egér bélből izolált gangliospherek ganglionléc eredetű sejtjei csirke bélben történő beültetése után teljes bélidegrendszert hoztak létre. Ezzel a kísérletes technikával igazoltuk, hogy a gangliosphere-ek őssejteket tartalmaznak.

A kísérleteket Dr. Donald Newgreen által vezetett kutatócsoport (Murdoch Children's Research Institute, Ausztrália) és a bostoni Harvard egyetem, gyermeksebészeti klinikájának kutatólaboratóriumával (Prof. Allan Goldstein labor) együttműködve végeztük.

*Nagy, N., Guyer, R. A., Hotta, R., Zhang, D., Newgreen, D. F., Halasy, V., Kovacs, T., & Goldstein, A. M. (2020). RET overactivation leads to concurrent Hirschsprung disease and intestinal ganglioneuromas. Development (Cambridge, England), dev.190900. in press*

### **5.) Embryonális bélidegrendszeri őssejtek izolálása és RNS szintű karakterizálása.**

A vándorló bélidegrendszeri őssejtek transzkriptom-analízise elengedhetetlenül szükséges, hogy megértsük a migráló sejtek molekuláris jellegzetességeit, mellyel később optimalizálni tudjuk a sejtek vándorlását a neurointesztinalis betegségek gyógyításához szükséges őssejt-transzplantáció során. Nagyon keveset tudunk a vándorló ganglionléc eredetű sejtek génexpressziós programjáról, mivel semmilyen molekuláris marker nem áll rendelkezésre ezen populáció szelektív jelölésére. A magas sejt-vándorlási képességgel rendelkező ENCC-k RNSseq analízise fényt deríthet azokra a génekre, amelyek a sejtek invazivitását szabályozzák (81.ábra).



**81. ábra: ENCC-k vándorlása az E11.5 *Wnt1;tdT* egér embryonális közép-, és utóbélben.** A magas sejt vándorlási képességgel rendelkező, E11.5 *Wnt1;tdT* egérembryoból izolált kolonizáló ganglionléc-sejtek (Kép: 1-es jelzet keret) és a vándorlást befejező, nyugvó ganglionléc-sejtek (Kép: 2-es kerettel jelzett sejt populáció) *RNSseq* analízise fényt deríthet azokra a génekre, amelyek a sejtek invazivitását határozzák meg. Ezzel lehetővé válna olyan új jelátviteli utak karakterizálása, melyek kulcsszerepet játszanak az embryonális és posztnatális idegsejtek vándorlásában.

**Összegzés:** Kutatócsoportom, kiemelten együttműködve a bostoni Harvard Egyetem Gyermeksebészeti Tanszékének őssejtkutató laboratóriumával, 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 sejttranszplantációt 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.

## **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 legmesszemenőig támogatott és már a PhD évek kezdetén témavezetőként ráállított a „jövő tudományára” az összejtekre 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 segítettek a munkámat, együtt dolgoztak velem és tudományos diákkörös munkájukat doktorandusz hallgatóként is mellettem folytatták. Köszönet a többi TDK hallgatómnak: 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 Balázsnak, Fügedi Jutkának, Orbán Editnek, Fölker Orsolyának, Vidra Györgynének, Jancsovics Dalmának, 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.

## Irodalomjegyzék

- Ackley, B. D., Crew, J. R., Elamaa, H., Pihlajaniemi, T., Kuo, C. J. és Kramer, J. M.** (2001). The NC1/endostatin domain of Caenorhabditis elegans type XVIII collagen affects cell migration and axon guidance. *J. Cell Biol.* **152**, 1219–1232.
- Acloque, H., Wilkinson, D. G. és Nieto, M. A.** (2008). Chapter 9 In Situ Hybridization Analysis of Chick Embryos in Whole-Mount and Tissue Sections. *Methods Cell Biol.* **87**, 169–185.
- Aisa, J., Lahoz, M., Serrano, P. J., Castiella, T., Junquera, C., Azanza, M. J. és Vera-Gil, A.** (1998). Histochemical, immunohistochemical, and electron microscopy study of the caudal portion of the chicken intestinal nerve of Remak. *Neurochem. Res.* **23**, 845–853.
- Akbareian, S. E., Nagy, N., Steiger, C. E., Mably, J. D., Miller, S. A., Hotta, R., Molnar, D. és Goldstein, A. M.** (2013). Enteric neural crest-derived cells promote their migration by modifying their microenvironment through tenascin-C production. *Dev Biol* **382**, 446–456.
- Allan, I. J. és Newgreen, D. F.** (1980). The origin and differentiation of enteric neurons of the intestine of the fowl embryo. *Am. J. Anat.* **157**, 137–154.
- Amiel, J. és Lyonnet, S.** (2001). Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J. Med. Genet.* **38**, 729–739.
- Anderson, R. B.** (2010). Matrix metalloproteinase-2 is involved in the migration and network formation of enteric neural crest-derived cells. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 63–69.
- Anderson, R. B., Stewart, A. L. és Young, H. M.** (2006a). Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways. *Cell Tissue Res.* **323**, 11–25.
- Anderson, R. B., Turner, K. N., Nikonenko, A. G., Hemperly, J., Schachner, M. és Young, H. M.** (2006b). The cell adhesion molecule I1 is required for chain migration of neural crest cells in the developing mouse gut. *Gastroenterology* **130**, 1221–1232.
- Asai, N., Fukuda, T., Wu, Z., Enomoto, A., Pachnis, V., Takahashi, M. és Costantini, F.** (2006). Targeted mutation of serine 697 in the Ret tyrosine kinase causes migration defect of enteric neural crest cells. *Development* **133**, 4507–4516.
- Bae, Y.-K., Macabenta, F., Curtis, H. L. és Stathopoulos, A.** (2017). Comparative analysis of gene expression profiles for several migrating cell types identifies cell migration regulators. *Mech. Dev.* **148**, 40–55.
- Balaskas, C., Saffrey, M. J. és Burnstock, G.** (1995). Distribution of NADPH-diaphorase activity in the embryonic chicken gut. *Anat. Embryol. (Berl)*. **192**, 239–245.
- Banerjee, S., Isaacman-Beck, J., Schneider, V. A. és Granato, M.** (2013). A Novel Role for Lh3 Dependent ECM Modifications during Neural Crest Cell Migration in Zebrafish. *PLoS One* **8**, e54609.
- Barber, A. J. és Lieth, E.** (1997). Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. *Dev. Dyn.* **208**, 62–74.
- Barlow, A., De Graaff, E. és Pachnis, V.** (2003). Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron* **40**, 905–916.

- Barlow, A. J., Wallace, A. S., Thapar, N. és Burns, A. J.** (2008). Critical numbers of neural crest cells are required in the pathways from the neural tube to the foregut to ensure complete enteric nervous system formation. *Development* **135**, 1681–1691.
- Bayliss, W. M. és Starling, E. H.** (1899). The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol.* **24**, 99–143.
- Baynash, A. G., Hosoda, K., Giaid, A., Richardson, J. A., Emoto, N., Hammer, R. E. és Yanagisawa, M.** (1994). Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* **79**, 1277–1285.
- Belkind-Gerson, J., Hotta, R., Nagy, N., Thomas, A. R., Graham, H., Cheng, L., Solorzano, J., Nguyen, D., Kamionek, M., Dietrich, J., és mtsai.** (2015). Colitis induces enteric neurogenesis through a 5-HT4-dependent mechanism. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 870–878.
- Bettors, E., Liu, Y., Kjaeldgaard, A., Sundström, E. és García-Castro, M. I.** (2010). Analysis of early human neural crest development. *Dev. Biol.* **344**, 578–592.
- Biau, S., Jin, S. és Fan, C.-M.** (2013). Gastrointestinal defects of the Gas1 mutant involve dysregulated Hedgehog and Ret signaling. *Biol. Open* **2**, 144–55.
- Bódi, I., Nagy, N., Sinka, L., Igyártó, B.-Z. és Oláh, I.** (2009). Novel monoclonal antibodies recognise guinea fowl thrombocytes. *Acta Vet. Hung.* **57**, 239–46.
- Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P. és Pachnis, V.** (2015). Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* **63**, 229–241.
- Bolande, R. P.** (1974). The neurocristopathies. A unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Hum. Pathol.* **5**, 409–429.
- Bondurand, N., Natarajan, D., Barlow, A., Thapar, N. és Pachnis, V.** (2006). Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development* **133**, 2075–2086.
- Bonnans, C., Chou, J. és Werb, Z.** (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 786–801.
- Bourikas, D., Pekarik, V., Baeriswyl, T., Grunditz, A., Sadhu, R., Nardó, M. és Stoeckli, E. T.** (2005). Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat. Neurosci.* **8**, 297–304.
- Bourret, A., Chauvet, N., de Santa Barbara, P. és Faure, S.** (2017). Colonic mesenchyme differentiates into smooth muscle before its colonization by vagal enteric neural crest-derived cells in the chick embryo. *Cell Tissue Res.* **368**, 503–511.
- Branchek, T. A. és Gershon, M. D.** (1989). Time course of expression of neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, and NADPH diaphorase activity in neurons of the developing murine bowel and the appearance of 5-hydroxytryptamine in mucosal enterochromaffin cells. *J. Comp. Neurol.* **285**, 262–273.
- Brand-Saberi, B. és Christ, B.** (2000). Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. *Curr. Top. Dev. Biol.* **48**, 1–42.
- Brand, M., Le Moullec, J. M., Corvol, P. és Gasc, J. M.** (1998). Ontogeny of endothelins-1 and -3, their receptors, and endothelin converting enzyme-1 in the early human embryo. *J. Clin. Invest.* **101**, 549–559.

- Breau, M. A., Pietri, T., Eder, O., Blanche, M., Brakebusch, C., Fassler, R., Thiery, J. P., Dufour, S., Fässler, R., Thiery, J. P., és mtsai.** (2006). Lack of beta1 integrins in enteric neural crest cells leads to a Hirschsprung-like phenotype. *Development* **133**, 1725–1734.
- Breau, M. A., Dahmani, A., Broders-Bondon, F., Thiery, J.-P. és Dufour, S.** (2009). Beta1 integrins are required for the invasion of the caecum and proximal hindgut by enteric neural crest cells. *Development* **136**, 2791–2801.
- Broders-Bondon, F., Paul-Gilloteaux, P., Carlier, C., Radice, G. L. és Dufour, S.** (2012a). N-cadherin and beta1-integrins cooperate during the development of the enteric nervous system. *Dev Biol* **364**, 178–191.
- Broders-Bondon, F., Paul-Gilloteaux, P., Carlier, C., Radice, G. L. és Dufour, S.** (2012b). N-cadherin and  $\beta$ 1-integrins cooperate during the development of the enteric nervous system. *Dev. Biol.* **364**, 178–91.
- Bronner-Fraser, M.** (1986). An antibody to a receptor for fibronectin and laminin perturbs cranial neural crest development in vivo. *Dev. Biol.* **117**, 528–36.
- Bronner-Fraser, M.** (1993). Mechanisms of neural crest cell migration. *Bioessays* **15**, 221–230.
- Bronner, M. E. és LeDouarin, N. M.** (2012). Development and evolution of the neural crest: An overview. *Dev. Biol.* **366**, 2–9.
- Bronner, M. E. és Simões-Costa, M.** (2016). The Neural Crest Migrating into the Twenty-First Century. In *Current Topics in Developmental Biology*, o. 115–134. Academic Press Inc.
- Brookes, S. J. H.** (2001). Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat. Rec.* **262**, 58–70.
- Burns, A. J. és Delalande, J.-M.** (2005). Neural crest cell origin for intrinsic ganglia of the developing chicken lung. *Dev. Biol.* **277**, 63–79.
- Burns, A. J. és Le Douarin, N. M.** (2001). Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. *Anat. Rec.* **262**, 16–28.
- Burns, A. J., Le Douarin, N. M. és Douarin, N. M.** (1998). The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* **125**, 4335–4347.
- Burns, A. J., Champeval, D. és Le Douarin, N. M.** (2000). Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Dev Biol* **219**, 30–43.
- Burns, A. J., Delalande, J.-M. M. M. és Le Douarin, N. M.** (2002). In ovo transplantation of enteric nervous system precursors from vagal to sacral neural crest results in extensive hindgut colonisation. *Development* **129**, 2785–2796.
- Burns, A. J., Goldstein, A. M., Newgreen, D. F., Stamp, L., Schäfer, K.-H., Metzger, M., Hotta, R., Young, H. M., Andrews, P. W., Thapar, N., és mtsai.** (2016). White paper on guidelines concerning enteric nervous system stem cell therapy for enteric neuropathies. *Dev. Biol.* **417**, 229–251.
- Burzynski, G. M., Nolte, I. M., Osinga, J., Ceccherini, I., Twigt, B., Maas, S., Brooks, A., Verheij, J., Plaza Menacho, I., Buys, C. H. C. M., és mtsai.** (2004). Localizing a putative mutation as the major contributor to the development of sporadic Hirschsprung disease to the RET genomic sequence between the promoter region and exon 2. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**, 604–612.



- Cacalano, G., Fariñas, I., Wang, L. C., Hagler, K., Forgie, A., Moore, M., Armanini, M., Phillips, H., Ryan, A. M., Reichardt, L. F., és mtsai.** (1998). GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron* **21**, 53–62.
- Cantrell, V. A., Owens, S. E., Chandler, R. L., Airey, D. C., Bradley, K. M., Smith, J. R. és Southard-Smith, E. M.** (2004). Interactions between Sox10 and EdnrB modulate penetrance and severity of aganglionosis in the Sox10Dom mouse model of Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2289–301.
- Caprioli, A., Jaffredo, T., Gautier, R., Dubourg, C. és Dieterlen-Lièvre, F.** (1998). Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1641–1646.
- Carmona-Fontaine, C., Matthews, H. K., Kuriyama, S., Moreno, M., Dunn, G. A., Parsons, M., Stern, C. D. és Mayor, R.** (2008). Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature* **456**, 957–961.
- Carrasquillo, M. M., McCallion, A. S., Puffenberger, E. G., Kashuk, C. S., Nouri, N. és Chakravarti, A.** (2002). Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nat. Genet.* **32**, 237–44.
- Catala, M., Teillet, M. A. és Le Douarin, N. M.** (1995). Organization and development of the tail bud analyzed with the quail-chick chimaera system. *Mech. Dev.* **51**, 51–65.
- Chakraborty, S., Lakshmanan, M., Swa, H. L. F., Chen, J., Zhang, X., Ong, Y. S., Loo, L. S., Akıncılar, S. C., Gunaratne, J., Tergaonkar, V., és mtsai.** (2015). An oncogenic role of Agrin in regulating focal adhesion integrity in hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* **6**, 6184.
- Chalazonitis, A. és Kessler, J. A.** (2012). Pleiotropic effects of the bone morphogenetic proteins on development of the enteric nervous system. *Dev. Neurobiol.* **72**, 843–856.
- Chalazonitis, A., Rothman, T. P., Chen, J. és Gershon, M. D.** (1998). Age-dependent differences in the effects of GDNF and NT-3 on the development of neurons and glia from neural crest-derived precursors immunoselected from the fetal rat gut: expression of GFRalpha-1 in vitro and in vivo. *Dev. Biol.* **204**, 385–406.
- Chalazonitis, A., Pham, T. D., Rothman, T. P., DiStefano, P. S., Bothwell, M., Blair-Flynn, J., Tessarollo, L. és Gershon, M. D.** (2001). Neurotrophin-3 is required for the survival-differentiation of subsets of developing enteric neurons. *J. Neurosci.* **21**, 5620–36.
- Chalazonitis, A., Pham, T. D., Li, Z., Roman, D., Guha, U., Gomes, W., Kan, L., Kessler, J. A. és Gershon, M. D.** (2008). Bone morphogenetic protein regulation of enteric neuronal phenotypic diversity: relationship to timing of cell cycle exit. *J Comp Neurol* **509**, 474–492.
- Chalazonitis, A., D’Autréaux, F., Pham, T. D., Kessler, J. A. és Gershon, M. D.** (2011). Bone morphogenetic proteins regulate enteric gliogenesis by modulating ErbB3 signaling. *Dev. Biol.* **350**, 64–79.
- Chauss, D., Brennan, L. A., Bakina, O. és Kantorow, M.** (2015). Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 5-mediated Removal of Apoptotic Cell Debris by the Eye Lens and Its Inhibition by UV Light Exposure. *J. Biol. Chem.* **290**, 30253–30266.
- Chevalier, N. R., Gazquez, E., Bidault, L., Guilbert, T., Vias, C., Vian, E., Watanabe, Y., Muller, L., Germain, S., Bondurand, N., és mtsai.** (2016). How Tissue Mechanical Properties Affect Enteric Neural Crest Cell Migration. *Sci. Rep.* **6**, 20927.

- Chiquet-Ehrismann, R., Kalla, P., Pearson, C. A., Beck, K. és Chiquet, M.** (1988). Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* **53**, 383–390.
- Costa, M., Brookes, S. J. és Hennig, G. W.** (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* **47 Suppl 4**, iv15-9; discussion iv26.
- Cui, J., Michaille, J.-J. J., Jiang, W. és Zile, M. H.** (2003). Retinoid receptors and vitamin A deficiency: differential patterns of transcription during early avian development and the rapid induction of RARs by retinoic acid. *Dev. Biol.* **260**, 496–511.
- D'Autréaux, F., Morikawa, Y., Cserjesi, P. és Gershon, M. D.** (2007). Hand2 is necessary for terminal differentiation of enteric neurons from crest-derived precursors but not for their migration into the gut or for formation of glia. *Development* **134**, 2237–2249.
- D'Autréaux, F., Margolis, K. G., Roberts, J., Stevanovic, K., Mawe, G., Li, Z., Karamooz, N., Ahuja, A., Morikawa, Y., Cserjesi, P., és mtsai.** (2011). Expression level of Hand2 affects specification of enteric neurons and gastrointestinal function in mice. *Gastroenterology* **141**, 576–87, 587.e1–6.
- Darnell, D. K. és Schoenwolf, G. C.** (2000). The chick embryo as a model system for analyzing mechanisms of development. *Methods Mol. Biol.* **135**, 25–9.
- Das, R. M., Van Hateren, N. J., Howell, G. R., Farrell, E. R., Bangs, F. K., Porteous, V. C., Manning, E. M., McGrew, M. J., Ohyama, K., Sacco, M. A., és mtsai.** (2006). A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon. *Dev. Biol.* **294**, 554–563.
- Dawson, T. M., Bredt, D. S., Fotuhi, M., Hwang, P. M. és Snyder, S. H.** (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7797–7801.
- De Bellard, M. E., Rao, Y. és Bronner-Fraser, M.** (2003). Dual function of Slit2 in repulsion and enhanced migration of trunk, but not vagal, neural crest cells. *J. Cell Biol.* **162**, 269–279.
- De Schepper, S., Verheijden, S., Aguilera-Lizarraga, J., Viola, M. F., Boesmans, W., Stakenborg, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., Boeckx, B., Dierckx de Casterlé, I., és mtsai.** (2019). Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell* **176**, 676.
- Delalande, J.-M., Barlow, A. J., Thomas, A. J., Wallace, A. S., Thapar, N., Erickson, C. A. és Burns, A. J.** (2008). The receptor tyrosine kinase RET regulates hindgut colonization by sacral neural crest cells. *Dev. Biol.* **313**, 279–292.
- Delalande, J.-M., Natarajan, D., Vernay, B., Finlay, M., Ruhrberg, C., Thapar, N. és Burns, A. J.** (2014). Vascularisation is not necessary for gut colonisation by enteric neural crest cells. *Dev. Biol.* **385**, 220–229.
- Delalande, J.-M., Thapar, N. és Burns, A. J.** (2015). Dual labeling of neural crest cells and blood vessels within chicken embryos using Chick(GFP) neural tube grafting and carbocyanine dye Dil injection. *J. Vis. Exp.* e52514.
- Dickson, B. J. és Keleman, K.** (2002). Netrins. *Curr. Biol.* **12**, R154-5.
- Dóra, D., Arciero, E., Hotta, R., Barad, C., Bhave, S., Kovacs, T., Balic, A., Goldstein, A. M. és Nagy, N.** (2018). Intraganglionic macrophages: a new population of cells in the enteric ganglia. *J. Anat.* **233**, 401–410.
- Dóra, D., Fejszák, N., Goldstein, A. M., Minkó, K. és Nagy, N.** (2017). Ontogeny of ramified CD45 cells in chicken embryo and their contribution to bursal secretory dendritic cells. *Cell Tissue Res.* **368**, 353–370.

- Druckenbrod, N. R. és Epstein, M. L.** (2005). The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev. Biol.* **287**, 125–133.
- Druckenbrod, N. R. és Epstein, M. L.** (2007). Behavior of enteric neural crest-derived cells varies with respect to the migratory wavefront. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **236**, 84–92.
- Druckenbrod, N. R. és Epstein, M. L.** (2009). Age-dependent changes in the gut environment restrict the invasion of the hindgut by enteric neural progenitors. *Development* **136**, 3195–3203.
- Durbec, P. L., Larsson-Blomberg, L. B., Schuchardt, A., Costantini, F. és Pachnis, V.** (1996). Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* **122**, 349–358.
- Dutt, S., Kléber, M., Matasci, M., Sommer, L. és Zimmermann, D. R.** (2006). Versican V0 and V1 guide migratory neural crest cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 12123–12131.
- Dutt, S., Cassoly, E., Dours-Zimmermann, M. T., Matasci, M., Stoeckli, E. T. és Zimmermann, D. R.** (2011). Versican V0 and V1 direct the growth of peripheral axons in the developing chick hindlimb. *J. Neurosci.* **31**, 5262–70.
- Eaker, E. Y.** (1998). Antimyenteric neuronal antibodies and motility. *Gastroenterology* **114**, 421–422.
- Eisen, J. S. és Smith, J. C.** (2008). Controlling morpholino experiments: Don't stop making antisense. *Development* **135**, 1735–1743.
- Emison, E. S., McCallion, A. S., Kashuk, C. S., Bush, R. T., Grice, E., Lin, S., Portnoy, M. E., Culler, D. J., Green, E. D. és Chakravarti, A.** (2005). A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature* **434**, 857–863.
- Enomoto, H., Araki, T., Jackman, A., Heuckeroth, R. O., Snider, W. D., Johnson, E. M. J. és Milbrandt, J.** (1998). GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* **21**, 317–324.
- Erickson, C. A. és Goins, T. L.** (2000). Sacral neural crest cell migration to the gut is dependent upon the migratory environment and not cell-autonomous migratory properties. *Dev. Biol.* **219**, 79–97.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H. és Jessell, T. M.** (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**, 661–673.
- Escot, S., Blavet, C., Härtle, S., Duband, J.-L. és Fournier-Thibault, C.** (2013). Misregulation of SDF1-CXCR4 signaling impairs early cardiac neural crest cell migration leading to conotruncal defects. *Circ. Res.* **113**, 505–516.
- Espinosa-Medina, I., Jevans, B., Boismoreau, F., Chettouh, Z., Enomoto, H., Müller, T., Birchmeier, C., Burns, A. J. és Brunet, J.-F.** (2017). Dual origin of enteric neurons in vagal Schwann cell precursors and the sympathetic neural crest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 11980–11985.
- Etchevers, H. C., Amiel, J. és Lyonnet, S.** (2006). Molecular bases of human neurocristopathies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **589**, 213–234.
- Fairman, C. L., Clagett-Dame, M., Lennon, V. A. és Epstein, M. L.** (1995). Appearance of neurons in the developing chick gut. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **204**, 192–201.
- Faure, C., Chalazonitis, A., Rheaume, C., Bouchard, G., Sampathkumar, S. G., Yarema, K. J. és Gershon, M. D.** (2007). Gangliogenesis in the enteric nervous system: roles of the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and its regulation by bone morphogenetic protein-4. *Dev Dyn* **236**, 44–59.

- Faure, S., McKey, J., Sagnol, S. és de Santa Barbara, P.** (2015). Enteric neural crest cells regulate vertebrate stomach patterning and differentiation. *Development* **142**, 331–342.
- Fedtsova, N., Perris, R. és Turner, E. E.** (2003). Sonic hedgehog regulates the position of the trigeminal ganglia. *Dev. Biol.* **261**, 456–469.
- Fitch, J. M., Birk, D. E., Linsenmayer, C. és Linsenmayer, T. F.** (1990). The spatial organization of Descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea. *J. Cell Biol.* **110**, 1457–68.
- Flynn, B., Bergner, A. J., Turner, K. N., Young, H. M. és Anderson, R. B.** (2007). Effect of Gdnf haploinsufficiency on rate of migration and number of enteric neural crest-derived cells. *Dev Dyn* **236**, 134–141.
- Foong, J. P. P., Nguyen, T. V., Furness, J. B., Bornstein, J. C. és Young, H. M.** (2012). Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development. *J. Physiol.* **590**, 2375–2390.
- Friedmacher, F. és Puri, P.** (2013). Hirschsprung's disease associated with Down syndrome: a meta-analysis of incidence, functional outcomes and mortality. *Pediatr. Surg. Int.* **29**, 937–946.
- Fu, M., Lui, V. C. H., Sham, M. H., Cheung, A. N. Y. és Tam, P. K. H.** (2003). HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **228**, 1–10.
- Fu, M., Tam, P. K., Sham, M. H. és Lui, V. C.** (2004a). Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study. *Anat Embryol* **208**, 33–41.
- Fu, M., Lui, V. C. H., Sham, M. H., Pachnis, V. és Tam, P. K. H.** (2004b). Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *J. Cell Biol.* **166**, 673–84.
- Fu, M., Vohra, B. P. S., Wind, D. és Heuckeroth, R. O.** (2006). BMP signaling regulates murine enteric nervous system precursor migration, neurite fasciculation, and patterning via altered Ncam1 polysialic acid addition. *Dev. Biol.* **299**, 137–50.
- Fu, M., Sato, Y., Lyons-Warren, A., Zhang, B., Kane, M. A., Napoli, J. L. és Heuckeroth, R. O.** (2010). Vitamin A facilitates enteric nervous system precursor migration by reducing Pten accumulation. *Development* **137**, 631–640.
- Fu, M., Barlow-Anacker, A. J., Kuruvilla, K. P., Bowlin, G. L., Seidel, C. W., Trainor, P. A. és Gosain, A.** (2020). 37/67-laminin receptor facilitates neural crest cell migration during enteric nervous system development. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*
- Fujimoto, T., Hata, J., Yokoyama, S. és Mitomi, T.** (1989). A study of the extracellular matrix protein as the migration pathway of neural crest cells in the gut: Analysis in human embryos with special reference to the pathogenesis of Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* **24**, 550–556.
- Fukuda, K., Tanigawa, Y., Fujii, G., Yasugi, S. és Hirohashi, S.** (1998). cFKBP/SMAP; a novel molecule involved in the regulation of smooth muscle differentiation. *Development* **125**, 3535–3542.
- Furness, J. B.** (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* **81**, 87–96.
- Furness, J. B. és Costa, M.** (1980). Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* **5**, 1–20.
- Gabriel, S. B., Salomon, R., Pelet, A., Angrist, M., Amiel, J., Fornage, M., Attié-Bitach, T., Olson, J. M., Hofstra, R., Buys, C., és mtsai.** (2002). Segregation at three loci explains familial and population

- risk in Hirschsprung disease. *Nat. Genet.* **31**, 89–93.
- Gandhi, S. és Bronner, M. E.** (2018). Insights into neural crest development from studies of avian embryos. *Int. J. Dev. Biol.* **62**, 179–190.
- Gandhi, S., Piacentino, M. L., Vieceli, F. M. és Bronner, M. E.** (2017). Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing for loss-of-function in the early chick embryo. *Dev. Biol.* **432**, 86–97.
- Ganz, J.** (2018). Gut feelings: Studying enteric nervous system development, function, and disease in the zebrafish model system. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **247**, 268–278.
- Gazquez, E., Watanabe, Y., Broders-Bondon, F., Paul-Gilloteaux, P., Heysch, J., Baral, V., Bondurand, N. és Dufour, S.** (2016). Endothelin-3 stimulates cell adhesion and cooperates with  $\beta$ 1-integrins during enteric nervous system ontogenesis. *Sci. Rep.* **6**, 37877.
- Gerety, S. S. és Wilkinson, D. G.** (2011). Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. *Dev. Biol.* **350**, 279–289.
- Gershon, M. D.** (1999a). The enteric nervous system: a second brain. *Hosp. Pract. (1995)* **34**, 31–2, 35–8, 41–2 passim.
- Gershon, M. D.** (1999b). Endothelin and the development of the enteric nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **26**, 985–988.
- Gershon, M. D., Chalazonitis, A. és Rothman, T. P.** (1993). From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. *J. Neurobiol.* **24**, 199–214.
- Goldstein, A. M. és Nagy, N.** (2008). A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo. *Pediatr. Res.* **64**, 326–33.
- Goldstein, A. M., Brewer, K. C., Doyle, A. M., Nagy, N. és Roberts, D. J.** (2005). BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech Dev* **122**, 821–833.
- Goldstein, A. M., Hofstra, R. M. W. és Burns, A. J.** (2013). Building a brain in the gut: Development of the enteric nervous system. *Clin. Genet.* **83**, 307–316.
- Goldstein, A. M., Thapar, N., Karunaratne, T. B. és De Giorgio, R.** (2016). Clinical aspects of neurointestinal disease: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Dev. Biol.* **417**, 217–228.
- Goyal, R. K. és Hirano, I.** (1996). The enteric nervous system. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1106–1115.
- Graham, H. K., Maina, I., Goldstein, A. M. és Nagy, N.** (2017). Intestinal smooth muscle is required for patterning the enteric nervous system. *J. Anat.* **230**, 567–574.
- Grover, M., Bernard, C. E., Pasricha, P. J., Lurken, M. S., Fausone-Pellegrini, M. S., Smyrk, T. C., Parkman, H. P., Abell, T. L., Snape, W. J., Hasler, W. L., és mtsai.** (2012). Clinical-histological associations in gastroparesis: results from the Gastroparesis Clinical Research Consortium. *Neurogastroenterol. Motil.* **24**, 531–9, e249.
- Grumet, M., Hoffman, S., Crossin, K. L. és Edelman, G. M.** (1985). Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 8075–8079.
- Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J. és Joyner, A. L.** (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* **75**, 463–476.
- Gumati, M. K., Magyar, A., Nagy, N., Kurucz, E., Felföldi, B. és Oláh, I.** (2003). Extracellular matrix of

- different composition supports the various splenic compartments of guinea fowl (*Numida meleagris*). *Cell Tissue Res.* **312**, 333–43.
- Gunn, M.** (1951). A study of the enteric plexuses in some amphibians. *Q. J. Microsc. Sci.* **92**, 55–77.
- Guo, F., Debidda, M., Yang, L., Williams, D. A. és Zheng, Y.** (2006). Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *J. Biol. Chem.* **281**, 18652–18659.
- Gyawali, C. P.** (2016). Achalasia: new perspectives on an old disease. *Neurogastroenterol. Motil.* **28**, 4–11.
- Hackett-Jones, E. J., Landman, K. A., Newgreen, D. F. és Zhang, D.** (2011). On the role of differential adhesion in gangliogenesis in the enteric nervous system. *J. Theor. Biol.* **287**, 148–159.
- Halfter, W., Schurer, B., Yip, J., Yip, L., Tsen, G., Lee, J. A. és Cole, G. J.** (1997). Distribution and substrate properties of agrin, a heparan sulfate proteoglycan of developing axonal pathways. *J. Comp. Neurol.* **383**, 1–17.
- Halfter, W., Dong, S., Schurer, B. és Cole, G. J.** (1998). Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* **273**, 25404–25412.
- Hall, D. E., Neugebauer, K. M. és Reichardt, L. F.** (1987). Embryonic neural retinal cell response to extracellular matrix proteins: developmental changes and effects of the cell substratum attachment antibody (CSAT). *J. Cell Biol.* **104**, 623–634.
- Hamburger, V.** (1939). The development and innervation of transplanted limb primordia of chick embryos. *J. Exp. Zool.* **80**, 347–389.
- HAMBURGER, V. és HAMILTON, H. L.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**, 49–92.
- Hao, M. M., Bornstein, J. C., Vanden Berghe, P., Lomax, A. E., Young, H. M. és Foong, J. P. P.** (2013). The emergence of neural activity and its role in the development of the enteric nervous system. *Dev. Biol.* **382**, 365–374.
- Hao, M. M., Foong, J. P. P., Bornstein, J. C., Li, Z. L., Vanden Berghe, P. és Boesmans, W.** (2016). Enteric nervous system assembly: Functional integration within the developing gut. *Dev. Biol.* **417**, 168–181.
- Hatch, J. és Mukouyama, Y.-S.** (2015). Spatiotemporal mapping of vascularization and innervation in the fetal murine intestine. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **244**, 56–68.
- Heanue, T. A. és Pachnis, V.** (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 466–79.
- Hearn, C. és Newgreen, D.** (2000). Lumbo-sacral neural crest contributes to the avian enteric nervous system independently of vagal neural crest. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **218**, 525–530.
- Hearn, C. J., Murphy, M. és Newgreen, D.** (1998). GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons in vitro. *Dev. Biol.* **197**, 93–105.
- Heljasvaara, R., Aikio, M., Ruotsalainen, H. és Pihlajaniemi, T.** (2017). Collagen XVIII in tissue homeostasis and dysregulation - Lessons learned from model organisms and human patients. *Matrix Biol.* **57–58**, 55–75.
- Hendershot, T. J., Liu, H., Sarkar, A. A., Giovannucci, D. R., Clouthier, D. E., Abe, M. és Howard, M. J.** (2007). Expression of Hand2 is sufficient for neurogenesis and cell type-specific gene expression



in the enteric nervous system. *Dev Dyn* **236**, 93–105.

- Henry, M. D., Satz, J. S., Brakebusch, C., Costell, M., Gustafsson, E., Fässler, R. és Campbell, K. P.** (2001). Distinct roles for dystroglycan, beta1 integrin and perlecan in cell surface laminin organization. *J. Cell Sci.* **114**, 1137–44.
- Heuckeroth, R. O., Lampe, P. A., Johnson, E. M. és Milbrandt, J.** (1998). Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. *Dev. Biol.* **200**, 116–129.
- Hillier, L. W., Miller, W., Birney, E., Warren, W., Hardison, R. C., Ponting, C. P., Bork, P., Burt, D. W., Groenen, M. A. M., Delany, M. E., és mtsai.** (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* **432**, 695–716.
- His, W.** (1868). *Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbelthierleibes : die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei / von Wilhelm His.* Leipzig : F.C.W. Vogel,.
- Hofstra, R. M., Wu, Y., Stulp, R. P., Elfferich, P., Osinga, J., Maas, S. M., Siderius, L., Brooks, A. S., vd Ende, J. J., Heydendael, V. M., és mtsai.** (2000). RET and GDNF gene scanning in Hirschsprung patients using two dual denaturing gel systems. *Hum. Mutat.* **15**, 418–29.
- Holschneider, A., Hutson, J., Peña, A., Bekhit, E., Chatterjee, S., Coran, A., Davies, M., Georgeson, K., Grosfeld, J., Gupta, D., és mtsai.** (2005). Preliminary report on the International Conference for the Development of Standards for the Treatment of Anorectal Malformations. In *Journal of Pediatric Surgery*, o. 1521–1526.
- Homma, S., Oppenheim, R. W., Yaginuma, H. és Kimura, S.** (2000). Expression pattern of GDNF, c-ret, and GFRalphas suggests novel roles for GDNF ligands during early organogenesis in the chick embryo. *Dev. Biol.* **217**, 121–137.
- Horowitz, M. és Fraser, R. J.** (1995). Gastroparesis: diagnosis and management. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* **213**, 7–16.
- Hoshino, M., Omura, N., Yano, F., Tsuboi, K., Kashiwagi, H. és Yanaga, K.** (2013). Immunohistochemical study of the muscularis externa of the esophagus in achalasia patients. *Dis. esophagus Off. J. Int. Soc. Dis. Esophagus* **26**, 14–21.
- Hosoda, K., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Baynash, A. G., Cheung, J. C., Giaid, A. és Yanagisawa, M.** (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* **79**, 1267–1276.
- Hotta, R., Stamp, L. A., Foong, J. P. P., McConnell, S. N., Bergner, A. J., Anderson, R. B., Enomoto, H., Newgreen, D. F., Obermayr, F., Furness, J. B., és mtsai.** (2013). Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon. *J. Clin. Invest.* **123**, 1182–1191.
- Hotta, R., Cheng, L. S., Graham, H. K., Pan, W., Nagy, N., Belkind-Gerson, J. és Goldstein, A. M.** (2016). Isogenic enteric neural progenitor cells can replace missing neurons and glia in mice with Hirschsprung disease. *Neurogastroenterol. Motil.* **28**, 498–512.
- Huang, R. és Christ, B.** (2000). Origin of the epaxial and hypaxial myotome in avian embryos. *Anat. Embryol. (Berl).* **202**, 369–374.
- Hutson, M. R. és Kirby, M. L.** (2007). Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 101–10.
- Huycke, T. R., Miller, B. M., Gill, H. K., Nerurkar, N. L., Sprinzak, D., Mahadevan, L. és Tabin, C. J.** (2019). Genetic and Mechanical Regulation of Intestinal Smooth Muscle Development. *Cell* **179**, 90-105.e21.

- Hynes, R. O. és Naba, A.** (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a004903.
- Iba, H.** (2000). Gene transfer into chicken embryos by retrovirus vectors. *Dev. Growth Differ.* **42**, 213–8.
- Igyarto, B. Z., Nagy, N., Magyar, A. és Olah, I.** (2008). Identification of the Avian B-Cell-Specific Bu-1 Alloantigen by a Novel Monoclonal Antibody. *Poult. Sci.* **87**, 351–355.
- Ishii, Y. és Mikawa, T.** (2005). Somatic transgenesis in the avian model system. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* **75**, 19–27.
- Ishii, Y., Reese, D. E. és Mikawa, T.** (2004). Somatic Transgenesis Using Retroviral Vectors in the Chicken Embryo. *Dev. Dyn.* **229**, 630–642.
- Iwashita, T., Kruger, G. M., Pardal, R., Kiel, M. J. és Morrison, S. J.** (2003). Hirschsprung disease is linked to defects in neural crest stem cell function. *Science (80-. )*. **301**, 972–976.
- Jiang, Y., Liu, M. tsai és Gershon, M. D.** (2003). Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev. Biol.* **258**, 364–384.
- Jin, S., Martinelli, D. C., Zheng, X., Tessier-Lavigne, M. és Fan, C.-M.** (2015). Gas1 is a receptor for sonic hedgehog to repel enteric axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E73-80.
- Kapur, R. P.** (1999). Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos. *Pediatr. Dev. Pathol.* **2**, 559–69.
- Kapur, R. P.** (2000a). Developmental disorders of the enteric nervous system. In *Gut*, .
- Kapur, R. P.** (2000b). Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev. Biol.* **227**, 146–155.
- Kapur, R. P.** (2001). Neuropathology of paediatric chronic intestinal pseudo-obstruction and related animal models. *J. Pathol.* **194**, 277–288.
- Kapur, R. P.** (2009). Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease. *Semin. Pediatr. Surg.* **18**, 212–223.
- Kapur, R. P., Yost, C. és Palmiter, R. D.** (1992). A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development* **116**, 167–175.
- Kapur, R. P., deSa, D. J., Luquette, M. és Jaffe, R.** (1995). Hypothesis: pathogenesis of skip areas in long-segment Hirschsprung's disease. *Pediatr. Pathol. Lab. Med.* **15**, 23–37.
- Kim, J., Lo, L., Dormand, E. és Anderson, D. J.** (2003). SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* **38**, 17–31.
- Kirchgessner, A. L. és Gershon, M. D.** (1990). Innervation of the pancreas by neurons in the gut. *J. Neurosci.* **10**, 1626–1642.
- Kobayashi, H., Hirakawa, H., Surana, R., O'Briain, D. S. és Puri, P.** (1995). Intestinal neuronal dysplasia is a possible cause of persistent bowel symptoms after pull-through operation for Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* **30**, 253–7; discussion 257-9.
- Kok, F. O., Shin, M., Ni, C.-W., Gupta, A., Grosse, A. S., van Impel, A., Kirchmaier, B. C., Peterson-Maduro, J., Kourkoulis, G., Male, I., és mtsai.** (2015). Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev. Cell* **32**, 97–108.

- Kolterud, A., Grosse, A. S., Zacharias, W. J., Walton, K. D., Kretovich, K. E., Madison, B. B., Waghray, M., Ferris, J. E., Hu, C., Merchant, J. L., és mtsai.** (2009). Paracrine Hedgehog signaling in stomach and intestine: new roles for hedgehog in gastrointestinal patterning. *Gastroenterology* **137**, 618–628.
- Kos, R., Tucker, R. P., Hall, R., Duong, T. D. és Erickson, C. A.** (2003). Methods for introducing morpholinos into the chicken embryo. *Dev. Dyn.* **226**, 470–7.
- Kruger, G. M., Mosher, J. T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T. és Morrison, S. J.** (2002). Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* **35**, 657–669.
- Kruger, G. M., Mosher, J. T., Tsai, Y.-H., Yeager, K. J., Iwashita, T., Garipey, C. E. és Morrison, S. J.** (2003). Temporally distinct requirements for endothelin receptor B in the generation and migration of gut neural crest stem cells. *Neuron* **40**, 917–929.
- Kuo, B. R. és Erickson, C. A.** (2010). Regional differences in neural crest morphogenesis. *Cell Adh. Migr.* **4**, 567–85.
- Kurahashi, M., Niwa, Y., Cheng, J., Ohsaki, Y., Fujita, A., Goto, H., Fujimoto, T. és Torihashi, S.** (2008). Platelet-derived growth factor signals play critical roles in differentiation of longitudinal smooth muscle cells in mouse embryonic gut. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* **20**, 521–531.
- Kurtz, A., Zimmer, A., Schnütgen, F., Brüning, G., Spener, F. és Müller, T.** (1994). The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* **120**, 2637–2649.
- Lahav, R., Ziller, C., Dupin, E. és Le Douarin, N. M.** (1996). Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3892–3897.
- Lake, J. I. és Heuckeroth, R. O.** (2013). Enteric nervous system development: Migration, differentiation, and disease. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **305**, G1-24.
- Lamanna, C., Costagliola, A., Vittoria, A., Mayer, B., Assisi, L., Botte, V. és Cecio, A.** (1999). NADPH-diaphorase and NOS enzymatic activities in some neurons of reptilian gut and their relationships with two neuropeptides. *Anat. Embryol. (Berl)*. **199**, 397–405.
- Landman, K. A., Simpson, M. J. és Newgreen, D. F.** (2007). Mathematical and experimental insights into the development of the enteric nervous system and Hirschsprung's disease. *Dev. Growth Differ.* **49**, 277–286.
- Landolt, R. M., Vaughan, L., Winterhalter, K. H. és Zimmermann, D. R.** (1995). Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development* **121**, 2303–2312.
- Lang, D., Chen, F., Milewski, R., Li, J., Lu, M. M. és Epstein, J. A.** (2000). Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J. Clin. Invest.* **106**, 963–71.
- Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessar, N., Richardson, W., Potocnik, A., Vanden Berghe, P. és Pachnis, V.** (2011). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J. Clin. Invest.* **121**, 3412–3424.
- Lasrado, R., Boesmans, W., Kleinjung, J., Pin, C., Bell, D., Bhaw, L., McCallum, S., Zong, H., Luo, L., Clevers, H., és mtsai.** (2017). Lineage-dependent spatial and functional organization of the

- mammalian enteric nervous system. *Science* **356**, 722–726.
- Le Douarin, N. M.** (1988). The Claude Bernard lecture, 1987. Embryonic chimeras: a tool for studying the development of the nervous and immune systems. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* **235**, 1–17.
- Le Douarin, N. M.** (2004). The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: A long and still ongoing story. *Mech. Dev.* **121**, 1089–1102.
- Le Douarin, N. M. és Teillet, M. A.** (1973). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **30**, 31–48.
- Le Douarin, N. M., Dieterlen-Lièvre, F., Teillet, M. A. és Ziller, C.** (2000). Interspecific chimeras in avian embryos. *Methods Mol. Biol.* **135**, 373–386.
- Lee, H.-O., Levrorse, J. M. és Shin, M. K.** (2003). The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors. *Dev. Biol.* **259**, 162–175.
- Leenders, E. és Sieber, W. K.** (1970). Congenital megacolon observation by Frederick Ruysch--1691. *J. Pediatr. Surg.* **5**, 1–3.
- Lei, J. és Howard, M. J.** (2011). Targeted deletion of Hand2 in enteric neural precursor cells affects its functions in neurogenesis, neurotransmitter specification and gangliogenesis, causing functional aganglionosis. *Development* **138**, 4789–4800.
- Leibl, M. A., Ota, T., Woodward, M. N., Kenny, S. E., Lloyd, D. A., Vaillant, C. R. és Edgar, D. H.** (1999). Expression of endothelin 3 by mesenchymal cells of embryonic mouse caecum. *Gut* **44**, 246–252.
- Liu, M. T., Kuan, Y. H., Wang, J., Hen, R. és Gershon, M. D.** (2009a). 5-HT4 receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. *J Neurosci* **29**, 9683–9699.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M. és Zhao, J. J.** (2009b). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 627–644.
- Liu, J. A.-J., Lai, F. P.-L., Gui, H.-S., Sham, M.-H., Tam, P. K.-H., Garcia-Barcelo, M.-M., Hui, C.-C. és Ngan, E. S.-W.** (2015). Identification of GLI Mutations in Patients With Hirschsprung Disease That Disrupt Enteric Nervous System Development in Mice. *Gastroenterology* **149**, 1837-1848.e5.
- Logan, M. és Tabin, C.** (1998). Targeted gene misexpression in chick limb buds using avian replication-competent retroviruses. *Methods* **14**, 407–420.
- Lotz, M. M., Burdsal, C. A., Erickson, H. P. és McClay, D. R.** (1989). Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J. Cell Biol.* **109**, 1795–1805.
- Lu, Y., Lin, C. és Wang, X.** (2009). PiggyBac transgenic strategies in the developing chicken spinal cord. *Nucleic Acids Res.* **37**, e141.
- Luider, T. M., Peters-van der Sanden, M. J., Molenaar, J. C., Tibboel, D., van der Kamp, A. W. és Meijers, C.** (1992). Characterization of HNK-1 antigens during the formation of the avian enteric nervous system. *Development* **115**, 561–572.
- Lyonnet, S., Bolino, A., Pelet, A., Abel, L., Nihoul-Fékété, C., Briard, M. L., Mok-Siu, V., Kaariainen, H., Martucciello, G., Lerone, M., és mtsai.** (1993). A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat. Genet.* **4**, 346–350.
- Margarido, A. S., Le Guen, L., Falco, A., Faure, S., Chauvet, N. és de Santa Barbara, P.** (2020). PROX1 is a specific and dynamic marker of sacral neural crest cells in the chicken intestine. *J. Comp.*

*Neurol.* **528**, 879–889.

**Martin, P. T. és Sanes, J. R.** (1997). Integrins mediate adhesion to agrin and modulate agrin signaling. *Development* **124**, 3909–3917.

**McCallion, A. S., Stames, E., Conlon, R. A. és Chakravarti, A.** (2003). Phenotype variation in two-locus mouse models of Hirschsprung disease: tissue-specific interaction between Ret and Ednrb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1826–1831.

**McCarthy, K. J.** (2015). The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin. In *Current topics in membranes*, o. 255–303. Academic Press Inc.

**McKeown, S. J., Chow, C. W. és Young, H. M.** (2001). Development of the submucous plexus in the large intestine of the mouse. *Cell Tissue Res.* **303**, 301–305.

**McKeown, S. J., Stamp, L., Hao, M. M. és Young, H. M.** (2013a). Hirschsprung disease: a developmental disorder of the enteric nervous system. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2**, 113–29.

**McKeown, S. J., Wallace, A. S. és Anderson, R. B.** (2013b). Expression and function of cell adhesion molecules during neural crest migration. *Dev. Biol.* **373**, 244–257.

**McKeown, S. J., Mohsenipour, M., Bergner, A. J., Young, H. M. és Stamp, L. A.** (2017). Exposure to GDNF Enhances the Ability of Enteric Neural Progenitors to Generate an Enteric Nervous System. *Stem cell reports* **8**, 476–488.

**McNagny, K. M., Petterson, I., Rossi, F., Flamme, I., Shevchenko, A., Mann, M. és Graf, T.** (1997). Thrombomucin, a novel cell surface protein that defines thrombocytes and multipotent hematopoietic progenitors. *J. Cell Biol.* **138**, 1395–407.

**Meier-Ruge, W. A., Brönnimann, P. B., Gambazzi, F., Schmid, P. C., Schmidt, C. P. és Stoss, F.** (1995). Histopathological criteria for intestinal neuronal dysplasia of the submucosal plexus (type B). *Virchows Arch.* **426**, 549–56.

**Melkonian, G., Wang, J. L., Chung, J., Munoz, N. és Talbot, P.** (2004). CD44 and tenascin play critical roles in growth and vascular development of the chick chorioallantoic membrane and are targets of cigarette smoke. *Anat. Embryol. (Berl).* **208**, 109–120.

**Memic, F., Knoflach, V., Sadler, R., Tegerstedt, G., Sundström, E., Guillemot, F., Pachnis, V. és Marklund, U.** (2016). Ascl1 Is Required for the Development of Specific Neuronal Subtypes in the Enteric Nervous System. *J. Neurosci.* **36**, 4339–50.

**Mendel, D. B., Schreck, R. E., West, D. C., Li, G., Strawn, L. M., Tanciongco, S. S., Vasile, S., Shawver, L. K. és Cherrington, J. M.** (2000). The angiogenesis inhibitor SU5416 has long-lasting effects on vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation and function. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 4848–4858.

**Meyer, F. és Moussian, B.** (2009). Drosophila multiplexin (Dmp) modulates motor axon pathfinding accuracy. *Dev. Growth Differ.* **51**, 483–498.

**Milstein, C.** (1999). The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *Bioessays* **21**, 966–973.

**Mograbi, B., Boccardi, R., Bourget, I., Busca, R., Rochet, N., Farahi-Far, D., Juhel, T. és Rossi, B.** (2001). Glial cell line-derived neurotrophic factor-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activities exert opposing effects on the ERK pathway: importance for the rescue of neuroectodermic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 45307–45319.

**Moore, M. W., Klein, R. D., Farinas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L. F., Ryan, A. M., Carver-Moore, K. és Rosenthal, A.** (1996). Renal and neuronal abnormalities in mice lacking

GDNF. *Nature* **382**, 76–79.

**Morikawa, Y., Zehir, A., Maska, E., Deng, C., Schneider, M. D., Mishina, Y. és Cserjesi, P.** (2009). BMP signaling regulates sympathetic nervous system development through Smad4-dependent and -independent pathways. *Development* **136**, 3575–3584.

**Mwizerwa, O., Das, P., Nagy, N., Akbareian, S. E., Mably, J. D. és Goldstein, A. M.** (2011). Gdnf is mitogenic, neurotrophic, and chemoattractive to enteric neural crest cells in the embryonic colon. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **240**, 1402–1411.

**Nagashimada, M., Ohta, H., Li, C., Nakao, K., Uesaka, T., Brunet, J.-F., Amiel, J., Trochet, D., Wakayama, T. és Enomoto, H.** (2012). Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression. *J. Clin. Invest.* **122**, 3145–58.

**Nagy, N. és Goldstein, A. M.** (2006a). Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev. Biol.* **293**, 203–17.

**Nagy, N. és Goldstein, A. M.** (2006b). Intestinal coelomic transplants: A novel method for studying enteric nervous system development. *Cell Tissue Res.* **326**, 43–55.

**Nagy, N. és Goldstein, A. M.** (2017). Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Semin. Cell Dev. Biol.* **66**, 94–106.

**Nagy, N. és Oláh, I.** (2010). Experimental evidence for the ectodermal origin of the epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius. *Development* **137**, 3019–3023.

**Nagy, N., Magyar, A. és Oláh, I.** (2001). A novel monoclonal antibody identifies all avian embryonic myogenic cells and adult smooth muscle cells. *Anat. Embryol. (Berl)*. **204**, 123–134.

**Nagy, N., Magyar, A., Tóth, M. és Oláh, I.** (2004). Origin of the bursal secretory dendritic cell. *Anat. Embryol. (Berl)*. **208**, 97–107.

**Nagy, N., Bíró, E., Takács, A., Pólos, M., Magyar, A. és Oláh, I.** (2005). Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. *Dev. Dyn.* **232**, 55–66.

**Nagy, N., Brewer, K. C., Mwizerwa, O. és Goldstein, A. M.** (2007). Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. *Dev Dyn* **236**, 73–83.

**Nagy, N., Mwizerwa, O., Yaniv, K., Carmel, L., Pieretti-Vanmarcke, R., Weinstein, B. M. és Goldstein, A. M.** (2009). Endothelial cells promote migration and proliferation of enteric neural crest cells via beta1 integrin signaling. *Dev. Biol.* **330**, 263–72.

**Nagy, N., Burns, A. J. és Goldstein, A. M.** (2012). Immunophenotypic characterization of enteric neural crest cells in the developing avian colorectum. *Dev. Dyn.* **241**, 842–51.

**Nagy, N., Barad, C., Graham, H. K., Hotta, R., Cheng, L. S., Fejszak, N. és Goldstein, A. M.** (2016). Sonic hedgehog controls enteric nervous system development by patterning the extracellular matrix. *Development* **143**, 264–275.

**Nataf, V., Lecoin, L., Eichmann, A. és Le Douarin, N. M.** (1996). Endothelin-B receptor is expressed by neural crest cells in the avian embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9645–9650.

**Nataf, V., Amemiya, A., Yanagisawa, M. és Le Douarin, N. M.** (1998). The expression pattern of endothelin 3 in the avian embryo. *Mech. Dev.* **73**, 217–220.

**Natarajan, D., Marcos-Gutierrez, C., Pachnis, V. és de Graaff, E.** (2002). Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* **129**, 5151–5160.



- Newgreen, D. F. és Hartley, L.** (1995). Extracellular matrix and adhesive molecules in the early development of the gut and its innervation in normal and spotting lethal rat embryos. *Acta Anat. (Basel)*. **154**, 243–260.
- Newgreen, D. F. és Murphy, M.** (2000). Neural crest cell outgrowth cultures and the analysis of cell migration. *Methods Mol. Biol.* **137**, 201–211.
- Newgreen, D. és Thiery, J. P.** (1980). Fibronectin in early avian embryos: synthesis and distribution along the migration pathways of neural crest cells. *Cell Tissue Res.* **211**, 269–91.
- Newgreen, D. F., Jahnke, I., Allan, I. J. és Gibbins, I. L.** (1980). Differentiation of sympathetic and enteric neurons of the fowl embryo in grafts to the chorio-allantoic membrane. *Cell Tissue Res.* **208**, 1–19.
- Newgreen, D. F., Southwell, B., Hartley, L. és Allan, I. J.** (1996). Migration of enteric neural crest cells in relation to growth of the gut in avian embryos. *Acta Anat. (Basel)*. **157**, 105–115.
- Ngan, E. S.-W., Garcia-Barceló, M.-M., Yip, B. H.-K., Poon, H.-C., Lau, S.-T., Kwok, C. K.-M., Sat, E., Sham, M.-H., Wong, K. K.-Y., Wainwright, B. J., és mtsai.** (2011). Hedgehog/Notch-induced premature gliogenesis represents a new disease mechanism for Hirschsprung disease in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **121**, 3467–3478.
- Niederreither, K.** (2003). The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. *Development* **130**, 2525–2534.
- Nishiyama, C., Uesaka, T., Manabe, T., Yonekura, Y., Nagasawa, T., Newgreen, D. F., Young, H. M. és Enomoto, H.** (2012). Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nat. Neurosci.* **15**, 1211–8.
- Oakley, R. A., Lasky, C. J., Erickson, C. A. és Tosney, K. W.** (1994). Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in the chicken embryo. *Development* **120**, 103–114.
- Obermayr, F., Hotta, R., Enomoto, H. és Young, H. M.** (2013). Development and developmental disorders of the enteric nervous system. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*
- Okamoto, N., Del Maestro, R., Valero, R., Monros, E., Poo, P., Kanemura, Y. és Yamasaki, M.** (2004). Hydrocephalus and Hirschsprung's disease with a mutation of L1CAM. *J Hum Genet* **49**, 334–337.
- Okamura, Y. és Saga, Y.** (2008). Notch signaling is required for the maintenance of enteric neural crest progenitors. *Development* **135**, 3555–3565.
- Oláh, I., Gumati, K. H., Nagy, N., Magyar, A., Kaspers, B. és Lillehoj, H.** (2002). Diverse expression of the K-1 antigen by cortico-medullary and reticular epithelial cells of the bursa of Fabricius in chicken and guinea fowl. *Dev. Comp. Immunol.* **26**, 481–488.
- Ormestad, M., Astorga, J., Landgren, H., Wang, T., Johansson, B. R., Miura, N. és Carlsson, P.** (2006). Foxf1 and Foxf2 control murine gut development by limiting mesenchymal Wnt signaling and promoting extracellular matrix production. *Development* **133**, 833–843.
- Paratore, C., Eichenberger, C., Suter, U. és Sommer, L.** (2002). Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3075–3085.
- Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lievre, F. és Buck, C. A.** (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* **100**, 339–349.

- Parikh, D. H., Tam, P. K., Van Velzen, D. és Edgar, D.** (1992a). Abnormalities in the distribution of laminin and collagen type IV in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* **102**, 1236–1241.
- Parikh, D. H., Tam, P. K., Lloyd, D. A., Van Velzen, D. és Edgar, D. H.** (1992b). Quantitative and qualitative analysis of the extracellular matrix protein, laminin, in Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* **27**, 991–5; discussion 995–6.
- Parikh, D. H., Tam, P. K., Van Velzen, D. és Edgar, D.** (1994). The extracellular matrix components, tenascin and fibronectin, in Hirschsprung's disease: an immunohistochemical study. *J. Pediatr. Surg.* **29**, 1302–6.
- Parikh, D. H., Leibl, M., Tam, P. K. és Edgar, D.** (1995). Abnormal expression and distribution of nidogen in Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* **30**, 1687–93.
- Patrick, A. és Epstein, O.** (2008). Review article: gastroparesis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **27**, 724–740.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C. és Brunet, J. F.** (1999). The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* **399**, 366–370.
- Payette, R. F., Bennett, G. S. és Gershon, M. D.** (1984). Neurofilament expression in vagal neural crest-derived precursors of enteric neurons. *Dev. Biol.* **105**, 273–287.
- Payette, R. F., Tennyson, V. M., Pomeranz, H. D., Pham, T. D., Rothman, T. P. és Gershon, M. D.** (1988). Accumulation of components of basal laminae: association with the failure of neural crest cells to colonize the presumptive aganglionic bowel of *ls/ls* mutant mice. *Dev. Biol.* **125**, 341–360.
- Perris, R. és Perissinotto, D.** (2000). Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech. Dev.* **95**, 3–21.
- Perris, R., Perissinotto, D., Pettway, Z., Bronner-Fraser, M., Mörgelin, M. és Kimata, K.** (1996). Inhibitory effects of PG-H/aggrecan and PG-M/versican on avian neural crest cell migration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **10**, 293–301.
- Peters-van der Sanden, M. J., Kirby, M. L., Gittenberger-de Groot, A., Tibboel, D., Mulder, M. P. és Meijers, C.** (1993). Ablation of various regions within the avian vagal neural crest has differential effects on ganglion formation in the fore-, mid- and hindgut. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **196**, 183–194.
- Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E. J., Huang, S. P., Saarma, M., Hoffer, B. J., és mtsai.** (1996). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* **382**, 73–76.
- Pomeranz, H. D. és Gershon, M. D.** (1990). Colonization of the avian hindgut by cells derived from the sacral neural crest. *Dev. Biol.* **137**, 378–394.
- Probstmeier, R. és Pesheva, P.** (1999). Tenascin-C inhibits beta1 integrin-dependent cell adhesion and neurite outgrowth on fibronectin by a disialoganglioside-mediated signaling mechanism. *Glycobiology* **9**, 101–114.
- Puig, I., Champeval, D., De Santa Barbara, P., Jaubert, F., Lyonnet, S. és Larue, L.** (2009). Deletion of *Pten* in the mouse enteric nervous system induces ganglioneuromatosis and mimics intestinal pseudoobstruction. *J. Clin. Invest.* **119**, 3586–3596.
- Ramalho-Santos, M., Melton, D. A. és McMahon, A. P.** (2000). Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* **127**, 2763–2772.
- Rao, M. és Gershon, M. D.** (2018). Enteric nervous system development: what could possibly go wrong? *Nat. Rev. Neurosci.* **19**, 552–565.

- Rehberg, S., Lischka, P., Glaser, G., Stamminger, T., Wegner, M. és Rosorius, O.** (2002). Sox10 is an active nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for Sox10-mediated transactivation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5826–5834.
- Reichenbach, B., Delalande, J.-M., Kolmogorova, E., Prier, A., Nguyen, T., Smith, C. M., Holzschuh, J. és Shepherd, I. T.** (2008). Endoderm-derived Sonic hedgehog and mesoderm Hand2 expression are required for enteric nervous system development in zebrafish. *Dev. Biol.* **318**, 52–64.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. és Tabin, C.** (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401–1416.
- Ring, C., Hassell, J. és Halfter, W.** (1996). Expression pattern of collagen IX and potential role in the segmentation of the peripheral nervous system. *Dev. Biol.* **180**, 41–53.
- Roberts, D. J.** (2000). Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **219**, 109–120.
- Roberts, D. J., Johnson, R. L., Burke, A. C., Nelson, C. E., Morgan, B. A. és Tabin, C.** (1995). Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* **121**, 3163–74.
- Roberts, D. J., Smith, D. M., Goff, D. J. és Tabin, C. J.** (1998). Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Development* **125**, 2791–801.
- Rothman, T. P., Goldowitz, D. és Gershon, M. D.** (1993). Inhibition of migration of neural crest-derived cells by the abnormal mesenchyme of the presumptive aganglionic bowel of ls/ls mice: analysis with aggregation and interspecies chimeras. *Dev. Biol.* **159**, 559–573.
- Rothman, T. P., Chen, J., Howard, M. J., Costantini, F., Schuchardt, A., Pachnis, V. és Gershon, M. D.** (1996). Increased expression of laminin-1 and collagen (IV) subunits in the aganglionic bowel of ls/ls, but not c-ret<sup>-/-</sup> mice. *Dev. Biol.* **178**, 498–513.
- Sánchez, M. P., Silos-Santiago, I., Frisén, J., He, B., Lira, S. A. és Barbacid, M.** (1996). Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* **382**, 70–73.
- Sasai, N., Toriyama, M. és Kondo, T.** (2019). Hedgehog Signal and Genetic Disorders. *Front. Genet.* **10**, 1103.
- Sasaki, T., Fukai, N., Mann, K., Göhring, W., Olsen, B. R. és Timpl, R.** (1998). Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.* **17**, 4249–4256.
- Sasselli, V., Pachnis, V. és Burns, A. J.** (2012). The enteric nervous system. *Dev. Biol.* **366**, 64–73.
- Sato, N., Matsuda, K., Sakuma, C., Foster, D. N., Oppenheim, R. W. és Yaginuma, H.** (2002). Regulated gene expression in the chicken embryo by using replication-competent retroviral vectors. *J. Virol.* **76**, 1980–1985.
- Schäppi, M. G., Staiano, A., Milla, P. J., Smith, V. V., Dias, J. A., Heuschkel, R., Husby, S., Mearin, M. L., Papadopoulou, A., Ruemmele, F. M., és mtsai.** (2013). A practical guide for the diagnosis of primary enteric nervous system disorders. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **57**, 677–686.
- Schemann, M.** (2005). Control of gastrointestinal motility by the „gut brain”; - the enteric nervous system. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **41 Suppl 1**, S4-6.
- Schill, E. M., Wright, C. M., Jamil, A., LaCombe, J. M., Roper, R. J. és Heuckeroth, R. O.** (2019). Down syndrome mouse models have an abnormal enteric nervous system. *JCI insight* **5**,.
- Schneider, S., Wright, C. M. és Heuckeroth, R. O.** (2019). Unexpected Roles for the Second Brain:

- Enteric Nervous System as Master Regulator of Bowel Function. *Annu. Rev. Physiol.* **81**, 235–259.
- Schrenk, S., Schuster, A., Klotz, M., Schleser, F., Lake, J., Heuckeroth, R. O., Kim, Y.-J., Laschke, M. W., Menger, M. D. és Schäfer, K.-H.** (2015). Vascular and neural stem cells in the gut: do they need each other? *Histochem. Cell Biol.* **143**, 397–410.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F. és Pachnis, V.** (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* **367**, 380–383.
- Schulte-Merker, S. és Stainier, D. Y. R.** (2014). Out with the old, in with the new: reassessing morpholino knockdowns in light of genome editing technology. *Development* **141**, 3103–3104.
- Seaman, C., Anderson, R., Emery, B. és Cooper, H. M.** (2001). Localization of the netrin guidance receptor, DCC, in the developing peripheral and enteric nervous systems. *Mech. Dev.* **103**, 173–175.
- Serbedzija, G. N., Burgan, S., Fraser, S. E. és Bronner-Fraser, M.** (1991). Vital dye labelling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos. *Development* **111**, 857–866.
- Shellito, P. C. és Warshaw, A. L.** (1984). Idiopathic intermittent gastroparesis and its surgical alleviation. *Am. J. Surg.* **148**, 408–412.
- Shepherd, I. és Eisen, J.** (2011). Development of the zebrafish enteric nervous system. *Methods Cell Biol.* **101**, 143–160.
- Shepherd, I. T. és Raper, J. A.** (1999). Collapsin-1/semaphorin D is a repellent for chick ganglion of Remak axons. *Dev. Biol.* **212**, 42–53.
- Shepherd, I. T., Pietsch, J., Elworthy, S., Kelsh, R. N. és Raible, D. W.** (2004). Roles for GFRalpha1 receptors in zebrafish enteric nervous system development. *Development* **131**, 241–249.
- Shin, M. K., Levorse, J. M., Ingram, R. S. és Tilghman, S. M.** (1999). The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* **402**, 496–501.
- Shyer, A. E., Tallinen, T., Nerurkar, N. L., Wei, Z., Gil, E. S., Kaplan, D. L., Tabin, C. J. és Mahadevan, L.** (2013). Villification: how the gut gets its villi. *Science* **342**, 212–218.
- Sidebotham, E. L., Woodward, M. N., Kenny, S. E., Lloyd, D. A., Vaillant, C. R. és Edgar, D. H.** (2002). Localization and endothelin-3 dependence of stem cells of the enteric nervous system in the embryonic colon. *J. Pediatr. Surg.* **37**, 145–150.
- Simkin, J. E., Zhang, D., Rollo, B. N. és Newgreen, D. F.** (2013). Retinoic acid upregulates ret and induces chain migration and population expansion in vagal neural crest cells to colonise the embryonic gut. *PLoS One* **8**, e64077.
- Simon-Assmann, P., Keding, M. és Haffen, K.** (1986). Immunocytochemical localization of extracellular-matrix proteins in relation to rat intestinal morphogenesis. *Differentiation*. **32**, 59–66.
- Simpson, M. J., Landman, K. A., Hughes, B. D. és F Newgreen, D.** (2006). Looking inside an invasion wave of cells using continuum models: proliferation is the key. *J. Theor. Biol.* **243**, 343–360.
- Simpson, M. J., Zhang, D. C., Mariani, M., Landman, K. A. és Newgreen, D. F.** (2007). Cell proliferation drives neural crest cell invasion of the intestine. *Dev. Biol.* **302**, 553–568.
- Skaba, R.** (2007). Historic milestones of Hirschsprung's disease (commemorating the 90th anniversary of Professor Harald Hirschsprung's death). *J. Pediatr. Surg.* **42**, 249–251.

- Smith, J., Cochard, P. és Le Douarin, N. M.** (1977). Development of choline acetyltransferase and cholinesterase activities in enteric ganglia derives from presumptive adrenergic and cholinergic levels of the neural crest. *Cell Differ.* **6**, 199–216.
- Soret, R., Mennetrey, M., Bergeron, K. F., Dariel, A., Neunlist, M., Grunder, F., Faure, C., Silversides, D. W. és Pilon, N.** (2015). A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease. *J. Clin. Invest.* **125**, 4483–4496.
- Soret, R., Schneider, S., Bernas, G., Christophers, B., Souchkova, O., Charrier, B., Righini-Grunder, F., Aspirot, A., Landry, M., Kembel, S. W., és mtsai.** (2020). Glial Cell Derived Neurotrophic Factor Induces Enteric Neurogenesis and Improves Colon Structure and Function in Mouse Models of Hirschsprung Disease. *Gastroenterology*.
- Southard-Smith, E. M., Kos, L. és Pavan, W. J.** (1998). Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom hirschsprung mouse model. *Nat. Genet.* **18**, 60–64.
- Spence, S. G. és Poole, T. J.** (1994). Developing blood vessels and associated extracellular matrix as substrates for neural crest migration in Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Int. J. Dev. Biol.* **38**, 85–98.
- Stern, C. D.** (2005). The chick; a great model system becomes even greater. *Dev. Cell* **8**, 9–17.
- Stewart, A. L., Anderson, R. B., Kobayashi, K. és Young, H. M.** (2008). Effects of NGF, NT-3 and GDNF family members on neurite outgrowth and migration from pelvic ganglia from embryonic and newborn mice. *BMC Dev. Biol.* **8**, 73.
- Stone, J. G., Spirling, L. I. és Richardson, M. K.** (1997). The neural crest population responding to endothelin-3 in vitro includes multipotent cells. *J. Cell Sci.* **110 ( Pt 1)**, 1673–1682.
- Streit, A., Tambalo, M., Chen, J., Grocott, T., Anwar, M., Sosinsky, A. és Stern, C. D.** (2013). Experimental approaches for gene regulatory network construction: the chick as a model system. *Genesis* **51**, 296–310.
- Su, J., Stenbjorn, R. S., Gorse, K., Su, K., Hauser, K. F., Ricard-Blum, S., Pihlajaniemi, T. és Fox, M. A.** (2012). Target-derived matricryptins organize cerebellar synapse formation through  $\alpha 3\beta 1$  integrins. *Cell Rep.* **2**, 223–230.
- Sukegawa, A., Narita, T., Kameda, T., Saitoh, K., Nohno, T., Iba, H., Yasugi, S. és Fukuda, K.** (2000). The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development* **127**, 1971–1980.
- SWENSON, O., RHEINLANDER, H. F. és DIAMOND, I.** (1949). Hirschsprung's disease; a new concept of the etiology; operative results in 34 patients. *N. Engl. J. Med.* **241**, 551–556.
- Szabó, A. és Mayor, R.** (2016). Modelling collective cell migration of neural crest. *Curr. Opin. Cell Biol.* **42**, 22–28.
- Szabó, A. és Mayor, R.** (2018). Mechanisms of Neural Crest Migration. *Annu. Rev. Genet.* **52**, 43–63.
- Szabó, A., Melchionda, M., Nastasi, G., Woods, M. L., Campo, S., Perris, R. és Mayor, R.** (2016). In vivo confinement promotes collective migration of neural crest cells. *J. Cell Biol.* **213**, 543–555.
- Taketomi, T., Yoshiga, D., Taniguchi, K., Kobayashi, T., Nonami, A., Kato, R., Sasaki, M., Sasaki, A., Ishibashi, H., Moriyama, M., és mtsai.** (2005). Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia. *Nat Neurosci* **8**, 855–857.
- Tan, S. S., Crossin, K. L., Hoffman, S. és Edelman, G. M.** (1987). Asymmetric expression in somites of cytotactin and its proteoglycan ligand is correlated with neural crest cell distribution. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7977–7981.
- Tan, S. S., Prieto, A. L., Newgreen, D. F., Crossin, K. L. és Edelman, G. M.** (1991). Cytotactin expression in somites after dorsal neural tube and neural crest ablation in chicken embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 6398–6402.
- Tanaka, H., Kinutani, M., Agata, A., Takashima, Y. és Obata, K.** (1990). Pathfinding during spinal tract formation in the chick-quail chimera analysed by species-specific monoclonal antibodies. *Development* **110**, 565–571.
- Taraviras, S., Marcos-Gutierrez, C. V., Durbec, P., Jani, H., Grigoriou, M., Sukumaran, M., Wang, L. C., Hynes, M., Raisman, G. és Pachnis, V.** (1999). Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development* **126**, 2785–2797.
- Teillet, M. A.** (1978). Evolution of the lumbo-sacral neural crest in the avian embryo: Origin and differentiation of the ganglionated nerve of Remak studied in interspecific quail-chick chimaerae. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **184**, 251–268.
- Teillet, M. A., Ziller, C. és Le Douarin, N. M.** (1999). Quail-chick chimeras. *Methods Mol. Biol.* **97**, 305–318.
- Tennyson, V. M., Payette, R. F., Rothman, T. P. és Gershon, M. D.** (1990). Distribution of hyaluronic acid and chondroitin sulfate proteoglycans in the presumptive aganglionic terminal bowel of Is/Is fetal mice: an ultrastructural analysis. *J. Comp. Neurol.* **291**, 345–362.
- Testaz, S., Delannet, M. és Duband, J.** (1999). Adhesion and migration of avian neural crest cells on fibronectin require the cooperating activities of multiple integrins of the (beta)1 and (beta)3 families. *J. Cell Sci.* **112 ( Pt 2)**, 4715–4728.
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. és Karamanos, N. K.** (2016). Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 4–27.
- Tierney, M. T., Gromova, A., Sesillo, F. B., Sala, D., Spenlé, C., Orend, G. és Sacco, A.** (2016). Autonomous Extracellular Matrix Remodeling Controls a Progressive Adaptation in Muscle Stem Cell Regenerative Capacity during Development. *Cell Rep.* **14**, 1940–1952.
- Tille, J.-C., Wang, X., Lipson, K. E., McMahon, G., Ferrara, N., Zhu, Z., Hicklin, D. J., Sleeman, J. P., Eriksson, U., Alitalo, K., és mtsai.** (2003). Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 signaling mediates VEGF-C(deltaNdeltaC)- and VEGF-A-induced angiogenesis in vitro. *Exp. Cell Res.* **285**, 286–298.
- Timmermans, J. P., Hens, J. és Adriaensen, D.** (2001). Outer submucous plexus: An intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anat. Rec.* **262**, 71–78.
- Tomac, A. C., Grinberg, A., Huang, S. P., Nosrat, C., Wang, Y., Borlongan, C., Lin, S. Z., Chiang, Y. H., Olson, L., Westphal, H., és mtsai.** (2000). Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha1 availability regulates glial cell line-derived neurotrophic factor signaling: evidence from mice carrying one or two mutated alleles. *Neuroscience* **95**, 1011–1023.
- Tongiorgi, E., Bernhardt, R. R., Zinn, K. és Schachner, M.** (1995). Tenascin-C mRNA is expressed in cranial neural crest cells, in some placodal derivatives, and in discrete domains of the embryonic zebrafish brain. *J. Neurobiol.* **28**, 391–407.
- Tosney, K. W., Dehnbostel, D. B. és Erickson, C. A.** (1994). Neural crest cells prefer the myotome's basal lamina over the sclerotome as a substratum. *Dev. Biol.* **163**, 389–406.



- Tucker, R. P.** (1993). The in situ localization of tenascin splice variants and thrombospondin 2 mRNA in the avian embryo. *Development* **117**, 347–358.
- Tucker, R. P.** (2001). Abnormal neural crest cell migration after the in vivo knockdown of tenascin-C expression with morpholino antisense oligonucleotides. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **222**, 115–119.
- Uchikawa, M., Takemoto, T., Kamachi, Y. és Kondoh, H.** (2004). Efficient identification of regulatory sequences in the chicken genome by a powerful combination of embryo electroporation and genome comparison. *Mech. Dev.* **121**, 1145–1158.
- Uesaka, T., Jain, S., Yonemura, S., Uchiyama, Y., Milbrandt, J. és Enomoto, H.** (2007). Conditional ablation of GFRalpha1 in postmigratory enteric neurons triggers unconventional neuronal death in the colon and causes a Hirschsprung's disease phenotype. *Development* **134**, 2171–2181.
- Uesaka, T., Nagashimada, M., Yonemura, S. és Enomoto, H.** (2008). Diminished Ret expression compromises neuronal survival in the colon and causes intestinal aganglionosis in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 1890–1898.
- Uesaka, T., Nagashimada, M. és Enomoto, H.** (2013). GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. *J. Neurosci.* **33**, 16372–16382.
- Uesaka, T., Nagashimada, M. és Enomoto, H.** (2015). Neuronal Differentiation in Schwann Cell Lineage Underlies Postnatal Neurogenesis in the Enteric Nervous System. *J. Neurosci.* **35**, 9879–9888.
- Uesaka, T., Young, H. M., Pachnis, V. és Enomoto, H.** (2016). Development of the intrinsic and extrinsic innervation of the gut. *Dev. Biol.* **417**, 158–167.
- Vanderwinden, J. M., Mailleux, P., Schiffmann, S. N., Vanderhaeghen, J. J. és De Laet, M. H.** (1992). Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N. Engl. J. Med.* **327**, 511–515.
- Vaos, G. C.** (1989). Quantitative assessment of the stage of neuronal maturation in the developing human fetal gut—a new dimension in the pathogenesis of developmental anomalies of the myenteric plexus. *J. Pediatr. Surg.* **24**, 920–925.
- Verne, G. N., Sallustio, J. E. és Eaker, E. Y.** (1997). Anti-myenteric neuronal antibodies in patients with achalasia. A prospective study. *Dig. Dis. Sci.* **42**, 307–313.
- Vielmetter, J., Stolze, B., Bonhoeffer, F. és Stuermer, C. A.** (1990). In vitro assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells. *Exp. brain Res.* **81**, 283–287.
- Visconti, R. P. és Hilfer, S. R.** (2002). Perturbation of extracellular matrix prevents association of the otic primordium with the posterior rhombencephalon and inhibits subsequent invagination. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **223**, 48–58.
- Vohra, B. P., Tsuji, K., Nagashimada, M., Uesaka, T., Wind, D., Fu, M., Armon, J., Enomoto, H. és Heuckeroth, R. O.** (2006). Differential gene expression and functional analysis implicate novel mechanisms in enteric nervous system precursor migration and neuritogenesis. *Dev Biol* **298**, 259–271.
- von Werder, A., Seidler, B., Schmid, R. M., Schneider, G. és Saur, D.** (2012). Production of avian retroviruses and tissue-specific somatic retroviral gene transfer in vivo using the RCAS/TVA system. *Nat. Protoc.* **7**, 1167–1183.
- Wallace, A. S. és Burns, A. J.** (2005). Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* **319**, 367–382.

- Wallace, K. N., Akhter, S., Smith, E. M., Lorent, K. és Pack, M. (2005). Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech. Dev.* **122**, 157–173.
- Wallace, A. S., Barlow, A. J., Navaratne, L., Delalande, J. M., Tauszig-Delamasure, S., Corset, V., Thapar, N. és Burns, A. J. (2009). Inhibition of cell death results in hyperganglionosis: implications for enteric nervous system development. *Neurogastroenterol Motil* **21**, 768-e49.
- Wallace, A. S., Tan, M. X., Schachner, M. és Anderson, R. B. (2011). L1cam acts as a modifier gene for members of the endothelin signalling pathway during enteric nervous system development. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* **23**, e510-22.
- Wang, X., Chan, A. K. K., Sham, M. H., Burns, A. J. és Chan, W. Y. (2011). Analysis of the sacral neural crest cell contribution to the hindgut enteric nervous system in the mouse embryo. *Gastroenterology* **141**, 992–996.
- Wang, Y., Wang, J., Pan, W., Zhou, Y., Xiao, Y., Zhou, K., Wen, J., Yu, T. és Cai, W. (2013). Common genetic variations in Patched1 (PTCH1) gene and risk of hirschsprung disease in the Han Chinese population. *PLoS One* **8**, e75407.
- Washington Smoak, I., Byrd, N. A., Abu-Issa, R., Goddeeris, M. M., Anderson, R., Morris, J., Yamamura, K., Klingensmith, J. és Meyers, E. N. (2005). Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development. *Dev. Biol.* **283**, 357–372.
- Weskamp, G. és Reichardt, L. F. (1991). Evidence that biological activity of NGF is mediated through a novel subclass of high affinity receptors. *Neuron* **6**, 649–663.
- Winder, S. J. (2001). The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 118–124.
- Woodward, M. N., Kenny, S. E., Vaillant, C., Lloyd, D. A. és Edgar, D. H. (2000). Time-dependent effects of endothelin-3 on enteric nervous system development in an organ culture model of Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* **35**, 25–29.
- Wray, C. J., Rich, T. A., Waguespack, S. G., Lee, J. E., Perrier, N. D. és Evans, D. B. (2008). Failure to recognize multiple endocrine neoplasia 2B: more common than we think? *Ann. Surg. Oncol.* **15**, 293–301.
- Wu, J. J., Chen, J. X., Rothman, T. P. és Gershon, M. D. (1999). Inhibition of in vitro enteric neuronal development by endothelin-3: mediation by endothelin B receptors. *Development* **126**, 1161–1173.
- Yamada, S., Nomura, T., Uebersax, L., Matsumoto, K., Fujita, S., Miyake, M. és Miyake, J. (2007). Retinoic acid induces functional c-Ret tyrosine kinase in human neuroblastoma. *Neuroreport* **18**, 359–363.
- Yamagishi, S., Kesavamoorthy, G., Bastmeyer, M. és Sato, K. (2016). Stripe Assay to Study the Attractive or Repulsive Activity of a Protein Substrate Using Dissociated Hippocampal Neurons. *J. Vis. Exp.*
- Yan, R.-T. és Wang, S.-Z. (2012). Production of high-titer RCAS retrovirus. *Methods Mol. Biol.* **884**, 193–199.
- Yan, H., Newgreen, D. F. és Young, H. M. (2003). Developmental changes in neurite outgrowth responses of dorsal root and sympathetic ganglia to GDNF, neurturin, and artemin. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **227**, 395–401.
- Yang, J. T., Liu, C. Z., Villavicencio, E. H., Yoon, J. W., Walterhouse, D. és Iannaccone, P. M. (1997). Expression of human GLI in mice results in failure to thrive, early death, and patchy Hirschsprung-like gastrointestinal dilatation. *Mol. Med.* **3**, 826–835.

- Yntema, C. L. és Hammond, W. S.** (1954). The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* **101**, 515–41.
- Yntema, C. L. és Hammond, W. S.** (1947). The development of the autonomic nervous system. *Biol. Rev.* **22**, 344–359.
- You, C. H., Chey, W. Y., Lee, K. Y., Menguy, R. és Bortoff, A.** (1981). Gastric and small intestinal myoelectric dysrhythmia associated with chronic intractable nausea and vomiting. *Ann. Intern. Med.* **95**, 449–451.
- Young, H. M.** (2005). Neural stem cell therapy and gastrointestinal biology. *Gastroenterology* **129**, 2092–2095.
- Young, H. M. és Newgreen, D.** (2001). Enteric neural crest-derived cells: origin, identification, migration, and differentiation. *Anat. Rec.* **262**, 1–15.
- Young, H. M., Hearn, C. J., Ciampoli, D., Southwell, B. R., Brunet, J. F. és Newgreen, D. F.** (1998). A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture. *Dev. Biol.* **202**, 67–84.
- Young, H. M., Ciampoli, D., Hsuan, J. és Canty, A. J.** (1999). Expression of Ret-, p75(NTR)-, Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **216**, 137–152.
- Young, H. M., Hearn, C. J., Farlie, P. G., Canty, A. J., Thomas, P. Q. és Newgreen, D. F.** (2001). GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Dev Biol* **229**, 503–516.
- Young, H. M., Bergner, A. J., Anderson, R. B., Enomoto, H., Milbrandt, J., Newgreen, D. F. és Whittington, P. M.** (2004). Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut. *Dev. Biol.* **270**, 455–473.
- Young, H. M., Bergner, A. J., Simpson, M. J., McKeown, S. J., Hao, M. M., Anderson, C. R. és Enomoto, H.** (2014). Colonizing while migrating: how do individual enteric neural crest cells behave? *BMC Biol.* **12**, 23.
- Zanin, M. K., Bundy, J., Ernst, H., Wessels, A., Conway, S. J. és Hoffman, S.** (1999). Distinct spatial and temporal distributions of aggrecan and versican in the embryonic chick heart. *Anat. Rec.* **256**, 366–380.
- Zhang, D., Brinas, I. M., Binder, B. J., Landman, K. A. és Newgreen, D. F.** (2010). Neural crest regionalisation for enteric nervous system formation: implications for Hirschsprung's disease and stem cell therapy. *Dev Biol* **339**, 280–294.
- Zhang, S.-C., Chen, F., Jiang, K.-L., Yuan, Z.-W. és Wang, W.-L.** (2014). Comparative proteomic profiles of the normal and aganglionic hindgut in human Hirschsprung disease. *Pediatr. Res.* **75**, 754–761.
- Zhou, R., Niwa, S., Homma, N., Takei, Y. és Hirokawa, N.** (2009). KIF26A is an unconventional kinesin and regulates GDNF-Ret signaling in enteric neuronal development. *Cell* **139**, 802–813.
- Zhu, L., Lee, H. O., Jordan, C. R. S., Cantrell, V. A., Southard-Smith, E. M. és Shin, M. K.** (2004). Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors. *Nat. Genet.* **36**, 732–737.
- Zimmer, J. és Puri, P.** (2015). Knockout mouse models of Hirschsprung's disease. *Pediatr. Surg. Int.* **31**, 787–794.

- Zong, Y. és Jin, R.** (2013). Structural mechanisms of the agrin-LRP4-MuSK signaling pathway in neuromuscular junction differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3077–3088.
- Zuhdi, N., Ortega, B., Giovannone, D., Ra, H., Reyes, M., Asención, V., McNicoll, I., Ma, L. és de Bellard, M. E.** (2015). Slit molecules prevent entrance of trunk neural crest cells in developing gut. *Int. J. Dev. Neurosci.* **41**, 8–16.